

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto del kbro3 sobre la calidad seminal y su
correlación con la citotoxicidad y genotoxicidad en
eritrocitos policromáticos de la médula ósea roja en
ratón “Mus musculus”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

César Eduardo Carvallo Muguerza

ASESOR

José Luis Rafael Pino Gaviño

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

*A mis padres Carlos Carvallo y Consuelo
Muguerza por su amor, paciencia, consejos,
guía y educación a lo largo de mi vida que
son una herencia de valor incalculable.*

*A mi hermano por ese cariño incondicional
que siempre ha demostrado.*

*A mi Mamá Teresa por preocuparse siempre
por mi bienestar sin importar el día ni la hora.*

A mi querida tía Elena.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al biólogo José Luis Rafael Pino Gaviño, Profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y corresponsable del laboratorio de Reproducción y Biología del desarrollo, por su inmenso apoyo y guía en la elaboración de esta tesis, por la confianza y paciencia brindada durante todo este tiempo.

A la bióloga Betty Shiga Oshige, Profesora de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y corresponsable del laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, por sus consejos y apoyo desde mi época de estudiante de academia hasta ahora.

A los bachilleres: Sergio Barahona, Marie Coca, Antuané Zeballos, Fernando Tapia y Pamela Acevedo, por su colaboración y participación en el piloto de este trabajo, en la manutención de los animales de experimentación y durante el desarrollo de la parte experimental.

A la Bachiller Jacquelyne Zarria, por sus aportes en el procesamiento histológico que en un futuro enriquecerán los resultados del presente estudio, también por esa amistad sincera que me ha acompañado desde hace varios años y que con el paso del tiempo no ha hecho más que fortalecerse.

Gracias a todos, por todo...

ABREVIATURAS

8-OH-dG	8-hidroxideoxiguanosina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
BrO_3^-	Anión bromato.
BSA	Seroalbúmina bovina.
C+C epid.	Cabeza y cola del epidídimo.
CN	Control negativo.
DE	Desviación estándar.
ENC	Eritrocito normocromático.
EPC	Eritrocito policromático.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
GS	Glutamina sintetasa.
GSH	Glutación reducido.
GSOO-	Radical peróxilo.
GSSG	Glutation disulfuro.
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno.
HO-	Anión hidróxilo.

IIP	Inoculación intraperitoneal.
KBrO	Bromuro de potasio.
KBrO ₃	Bromato de potasio.
LD ₅₀	Dosis letal media.
MN	Micronúcleo.
MOR	Médula ósea roja.
NO	Óxido nítrico.
NO ₂	Dióxido de nitrógeno.
NO ₃	Óxido nitroso.
NOS	Especies reactivas de nitrógeno.
O ₂ ⁻	Radical anión peróxido.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONOO-	Peroxinitrito.
ONOOH	Ácido peroxinitroso.
PBS	Buffer fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>).
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>).
SOD	Superóxido dismutasa.
Z de K-S	Estadístico Z de la prueba Kolmogorov - Smirnov.

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Secuencia temporal (en días) y del desarrollo de la espermatogénesis en *Mus musculus* para el establecimiento de los grupos de tratamiento. Tipo A y B: Espermatogonias tipo A y tipo B. ES: Espermatocito secundario (Tomado de Piña y Guzmán *et al.* 2005; traducido por Díaz, 2007).

Figura N° 2: Variación del PC en gramos de los ratones en los grupos de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 3: Peso del testículo (g) de los animales tratados con KBrO₃ (Grupo I, II, III y IV) y del CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 4: Peso del conducto deferente, cabeza y cuerpo del epidídimo y de la cola del epidídimo de los animales tratados con KBrO₃ (Grupo I, II, III y IV) y del CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 5: Porcentajes de los valores espermáticos para la motilidad en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 6: Porcentajes de los valores espermáticos para la vitalidad espermática en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 7: Porcentajes de los valores espermáticos para la integridad de membrana normal en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 8: Concentración espermática en millones/mL obtenido a partir de los espermatogramas para cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 9: Índice de citotoxicidad obtenido a partir de la relación EPC/ENC de la MOR por cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Figura N° 10: Índice de genotoxicidad por formación de MNs en los EPCs de la MOR por cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN.

Anexo N° 1: Esquema del mecanismo de acción del KBrO₃ dentro del riñón. Tomado de Watanabe *et al.*, (2001) y traducido por el autor.

Anexo N° 2: Esquema del sistema reproductor masculino de *Mus musculus* señalando sus partes, tomado de Cook (2014) y traducido por el autor.

Anexo N° 3: Esquema general de la espermatogénesis mostrando parte del sistema reproductor masculino de ratón y las estructuras que permiten la realización del ciclo espermatogénico. *Encyclopaedia Britannica, Inc.* (2010).

Anexo N° 4: Fotografía de los órganos reproductivos con resolución de 5MP. A) Órganos unidos y B) órganos seccionados (1: Testículo, 2: Epidídimo, 3: Conducto deferente y 4: Cuerpo graso).

Anexo N° 5: Fotomicrografía de espermatozoides normales de ratón (*Mus musculus*), tomado con microscopía de campo claro, mostrando: 1) La cabeza, 2) pieza intermedia y 3) flagela o cola. Aumento: 400X.

Anexo N° 6: Fotomicrografía de espermatozoides anormales de ratón (*Mus musculus*) tomados con microscopía de campo claro. a) Espermatozoide con región cefálica anormal y b) pieza intermedia anormal (flecha). Coloración: Eosina Y. Aumento: 400X.

Anexo N° 7: Fotomicrografía de células de la Médula Ósea Roja de ratón tratado con KBrO_3 y evaluados con el test de Mn. 1) ENC, 2) EPC y 3) EPC con MN (flecha). Aumento; 400X.

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Valores obtenidos para el estadístico Z de K-S y la prueba de Levene mediante el paquete estadístico SPSS 20.0. Esp.: Espermatozoide.

Tabla N° 2: PCs y pesos de órganos reproductivos de los ratones tratados con KBrO_3

Tabla N° 3: Porcentajes de los valores espermáticos correspondientes a la movilidad, vitalidad e integridad de la membrana espermática para los diferentes grupos de tratamiento.

Tabla N° 4: Porcentajes de los valores espermáticos correspondientes a la morfología espermática para los diferentes grupos de tratamiento (A.: Anomalías).

Tabla N° 5: Concentración espermática en millones/mL obtenido por los espermogramas aplicados a cada grupo de tratamiento.

Tabla N° 6: Índices de citotoxicidad y genotoxicidad (evaluada como EPC con Mn) observada para cada grupo de tratamiento.

Tabla N° 7: Correlación de Pearson y valores p de significancia bilateral entre los parámetros seminales y los índices de citotoxicidad y genotoxicidad en MOR.

Tabla N° 8: Datos obtenidos mediante los espermogramas aplicados a los ratones de cada grupo de tratamiento. Var. PC: Variación del peso corporal, Test. Der.: Testículo derecho, Cond. Def.: Conducto deferente, Ep. C+C: Cabeza y cuerpo del epidídimo, Ep.

Cola: Cola del epidídimo, MP: Móviles progresivos, MNP: Móviles no progresivos, NM: No móviles. Conteo de 100 células espermáticas por cada variable.

Tabla N° 9: Datos obtenidos mediante los espermogramas aplicados a los ratones de cada grupo de tratamiento. PI: Pieza intermedia. Conteo de 100 células espermáticas por cada variable.

Tabla N° 10: Datos obtenidos mediante la extracción de la MOR de los ratones de cada grupo de tratamiento. EPC/ENC: Índice de citotoxicidad entre los eritrocitos policromáticos y los eritrocitos normocromáticos para evaluación de la citotoxicidad, EPC-1MN: Genotoxicidad determinada por el número de eritrocitos policromáticos con 1 micronúcleo dentro de un conteo de 2000 EPCs.

Tabla N° 11: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de todas las variables estudiadas.

Tabla N° 12: Prueba de Levene mediante ANOVA para determinar la homogeneidad de varianzas de todas las variables estudiadas.

Tabla N° 13: Prueba ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para las variables estudiadas.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
II.1.	GENERALIDADES SOBRE EL BROMATO DE POTASIO (KBrO_3).	3
II.2.	APARATO REPRODUCTOR MASCULINO DE <i>Mus musculus</i> .	5
II.3.	FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS Y LA MEDIDA DE INESTABILIDAD GENÉTICA: CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD <i>in vivo</i> .	7
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
III.1.	HIPÓTESIS.	11
III.2.	OBJETIVO GENERAL.	11
III.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	11
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
IV.1.	MATERIALES.	12
IV.1.1.	Material biológico.	12
IV.1.2.	Equipos.	12
IV.1.3.	Material de vidrio y otros instrumentos	13
IV.1.4.	Reactivos.	14
IV.2.	MÉTODOS	14

IV.2.1. Preparación, determinación de la dosis y administración del KBrO_3 .	14
IV.2.2. Diseño experimental.	14
IV.2.3. Determinación de los pesos de los órganos reproductivos.	16
IV.2.4. Evaluación de espermogramas.	16
IV.2.4.1. Examen microscópico inicial.	17
IV.2.4.1.1. Análisis de la motilidad espermática.	17
IV.2.4.1.2. Análisis de la vitalidad espermática.	17
IV.2.4.2. Examen microscópico detallado.	18
IV.2.4.2.1. Análisis de la morfología espermática.	18
IV.2.4.2.2. Concentración espermática.	18
IV.2.4.2.3. Test hipo-osmótico (test HOST) para evaluar la integridad de la membrana espermática.	19
IV.2.5. Evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad.	19
IV.2.5.1. Índice de citotoxicidad.	20
IV.2.5.2. Índice de genotoxicidad.	20
IV.2.6. Análisis estadístico.	20
V. RESULTADOS	22

V.1.	DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS Y DE LA HOMOGENEIDAD DE LAS VARIANZAS.	22
V.2.	ANÁLISIS DE LOS PESOS CORPORALES Y DE LOS PESOS DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS.	22
V.3.	EVALUACIÓN DE ESPERMATOGRAMAS.	26
	V.3.1. Motilidad	26
	V.3.2. Vitalidad	26
	V.3.3. Conteo espermático	27
V.4.	CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.	31
V.5.	CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS SEMINALES Y LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD EN LA MÉDULA ÓSEA ROJA.	33
VI.	DISCUSIÓN	36
VII.	CONCLUSIONES	42
VIII.	RECOMENDACIONES	43
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
X.	ANEXOS	52

RESUMEN

El KBrO_3 es un compuesto químico oxidante clasificado como tóxico que se sigue utilizado a pesar de las restricciones o prohibiciones en su uso. Las investigaciones lo muestran como inductor de citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, etc; sin embargo, los datos obtenidos en el sistema reproductivo masculino son insuficientes para ser concluyentes. Con la finalidad de estudiar los efectos de la exposición prolongada del KBrO_3 en 4 momentos de un ciclo espermatogénico completo y en la línea eritropoyética de la Médula Ósea Roja (MOR), se dividió aleatoriamente un grupo de 50 ratones en 5 grupos de tratamiento, los cuales fueron sometidos a inoculaciones intraperitoneales diarias de este compuesto químico. Los grupos fueron: Grupo I: Día 7, Grupo II: Día 15, Grupo III: Día 21, Grupo IV: Día 35 y Grupo V: Control Negativo (CN). En cada grupo se realizaron espermogramas acorde con los parámetros de la OMS, (2010) y evaluaciones de citotoxicidad y genotoxicidad en la médula ósea roja. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA con la prueba *post hoc* de Tukey en el programa SPSS 20.0. Los resultados (media \pm DE) mostraron que los órganos reproductivos analizados disminuyen significativamente su peso a partir del Grupo III. Se observó que en el Grupo I el porcentaje de espermatozoides no móviles se elevó ($26,50 \pm 3,69$ vs. $19,30 \pm 4,45$ del CN), de vitalidad espermática se redujo ($68,90 \pm 2,33$ vs. $75,50 \pm 1,90$ del CN) y el de espermatozoides con membrana normal se redujo ($49,40 \pm 2,50$ vs. $63,90 \pm 1,90$ del CN) de forma significativa. En el Grupo II, los espermatozoides morfológicamente normales se redujeron desde $96,40 \pm 1,69$ del CN hasta $93,30 \pm 1,63$ y la concentración espermática disminuyó a $49,80 \pm 3,62$ millones/mL (de los $55,60 \pm 2,84$ millones/mL del CN). Estas afecciones se incrementaron significativamente en los Grupos III y IV evidenciando un efecto acumulativo en la línea

germinal espermática. A nivel de la médula ósea roja, el índice de citotoxicidad mostró diferencias significativas desde el Grupo I ($0,6479 \pm 0,0153$ vs. $0,9627 \pm 0,0102$ del CN) y se mantuvo constante para los tratamientos restantes, la genotoxicidad mostró un efecto negativo desde el Grupo I ($16,05 \pm 1,87$ vs. los $3,20 \pm 1,03$ del CN) que fue acumulativo y se incrementó con los tratamientos restantes. La toxicidad en la línea germinal espermática y la toxicidad en la línea eritropoyética de la médula ósea roja no mostraron correlación significativa. Por lo tanto se concluye; que el KBrO_3 induce efectos tóxicos no correlacionados en ambas líneas celulares de ratones reduciendo el potencial fértil y provocando citotoxicidad y genotoxicidad en la línea eritropoyética.

ABSTRACT

The KBrO_3 is an oxidant and toxic compound that is still used, despite restrictions or prohibitions. Researchs shows it as cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, teratogenicity, carcinogenicity-inducing, etc; however the data obtained in the male reproductive system are insufficient to be conclusive. In order to study the effects of protracted exposures of KBrO_3 in 4 moments of a complete sperm germline cycle and red bone marrow (RBM) erythropoietic line, a group of 50 mice was randomly divided in five treatment groups of 10 mice each, which were subjected to daily injections of this chemical compound, groups were: Group I: Day 7, Group II: Day 15, Group III: Day 21, Group IV: Day 35 and Group V: Negative Control (NC). For each of these groups were performed spermatogram tests according to the WHO (2012) recommended parameters and cytotoxicity and genotoxicity tests in the red bone marrow. Statistical analyses were performed using ANOVA with Tukey *post hoc* test in SPSS 20.0 program. The results (mean \pm SD) show that the reproductive organs significantly decrease its weight in Group III. In Group I of treatment the percentage of no motile spermatozoa number was increase (26,50 \pm 3,69 vs. 19,30 \pm 4,45 from NC), sperm vitality was reduced (68,90 \pm 2,33 vs. 75,50 \pm 1,90 from NC), and the spermatozoa with normal membrane was reduced (49,40 \pm 2,50 vs. 63,90 \pm 1,90 from NC). In Group II, the morphologically normal spermatozoa was reduced to 93,30 \pm 1,63 (vs. 96,40 \pm 0,69 from NC) and sperm concentration decreased to 49,80 \pm 3,62 million per mL (vs. 55,60 \pm 2,84 million from NC), in Groups III and IV these conditions were increased significantly showing a cumulative effect on sperm germline. The red bone marrow cytotoxicity level showed significant differences from Group I (0,6479 \pm 0,0153 vs. 0,9627 \pm 0,0102 from NC) and remained constant for the remaining treatments, genotoxicity showed cumulative effect increased with treatments from group I (16,05 \pm 1,87 vs. 3,20 \pm 1,03 from NC). The toxicity in sperm

germline and toxicity in red bone marrow erythropoietic line showed no significant correlation. Therefore it is concluded that KBrO_3 induces toxic effects uncorrelated in both mice cells lines reducing fertility potential and causing cytotoxicity and genotoxicity in the erythropoietic line.

I.INTRODUCCIÓN

O'Donogue (1999) describió al Bromato de potasio (KBrO_3) como un compuesto oxidante que tiene varios usos tanto en la industria como en la actividad doméstica, Budavari (1989), Chipman (1998) y Ribotta (1999) entre otros, expusieron los usos de este xenobiótico en diferentes aspectos de la vida humana y los efectos tóxicos que presentó. Los trabajos de Ishidate (1980), Hayashi (1988, 1989, 1992) y O'Donogue (1999) mostraron las propiedades citotóxicas, mutagénicas y genotóxicas del compuesto; Kasai *et al.* (1987) y Hayashi *et al.* (1992), mostraron que el KBrO_3 es capaz de inducir la peroxidación lipídica a nivel de membranas celulares e inducir alteraciones por oxidación de la cromatina en células hepáticas y renales como consecuencia de la elevación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) a pesar de los mecanismos de protección que la célula presenta frente a estas alteraciones negativas durante el desarrollo del ciclo celular.

En 1992, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) consideraron al KBrO_3 como una sustancia nociva para los humanos debido a que su ingestión prolongada induce vómitos, vértigo, diarreas, metahemoglobinemia, daños en los tejidos renales, hepáticos, pancreáticos y estomacales (Watanabe *et al.*, 2004). A pesar de las restricciones y prohibiciones, este compuesto se sigue utilizando en el Perú a nivel artesanal; las poblaciones con menores recursos económicos lo emplean en la fabricación de pan artesanal y de cosméticos, se le encuentra también en la cocina tradicional china y pequeñas trazas de KBrO_3 fueron producidas involuntariamente por algunas empresas de bebidas que realizaban la purificación de agua mediante la ozonificación (Himata *et al.*, 1994; Chipman *et al.* 1998).

Al ingresar al organismo de un mamífero, el bromato es rápidamente absorbido por el aparato gastrointestinal (Fuji *et al.*, 1984) y pasa a las vías circulatorias en poco tiempo (aproximadamente en 15 minutos) (Parker y Barr, 1951), termina distribuyéndose en órganos y células del cuerpo como el riñón, páncreas, estómago, intestino delgado y glóbulos rojos (Fuji *et al.*, 1984). En el riñón, el bromato se reduce a bromuro (compuesto no tóxico) (Kutom *et al.*, 1990); sin embargo, se le encuentra en cantidades muy reducidas debido a que el KBrO_3 es altamente estable (Watanabe *et al.*, 2004).

Por lo tanto, se tiene conocimiento de los efectos negativos que pueden ser inducidos en varios tipos de tejidos en los mamíferos por el consumo de alimentos, líquidos o sustancias en general que contienen trazas de bromato; sin embargo, hace falta profundizar si los efectos tóxicos del KBrO_3 pueden afectar la capacidad reproductiva. Algunos reportes previos han evidenciado daños a nivel embrionario, una reducción significativa de la tasa de implantación (Gonzales *et al.*, 2007; Huatuco, 2008) y otros a nivel del ADN (Hayashi *et al.*, 1992).

El presente trabajo enfoca los análisis en los efectos producidos por la administración intraperitoneal del KBrO_3 en dos líneas celulares que se encuentran en constante división: 1) La línea germinal masculina, que permite evaluar los efectos a nivel de la fertilidad durante cuatro momentos del ciclo espermatogénico y 2) La línea eritropoyética de la MOR, para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad inducida en los eritrocitos policromáticos durante los mismos 4 momentos. Esto, con la finalidad de conocer las consecuencias de las exposiciones crónicas al KBrO_3 y si los efectos tóxicos inducidos, entre estas dos líneas celulares distintas, presentan alguna correlación estadística entre la citotoxicidad y genotoxicidad inducida, el tiempo de exposición y el estadio celular de la línea germinal.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. GENERALIDADES SOBRE EL BROMATO DE POTASIO (KBrO_3).

El KBrO_3 es un agente químico oxidante (O'Donogue *et al.*, 1999), cristalino, blanco y fácilmente soluble en agua (Budavari *et al.*, 1989), que es empleado de diferentes maneras en procesos que tienen que ver directamente con el consumo humano. Se encuentra en el procesamiento de la masa de panes, tortas, pasteles, etc., otorgando ciertas ventajas durante la obtención del producto como el incremento del volumen de la masa (Ribotta *et al.*, 1999), se le utiliza también en soluciones cosméticas que permiten la formación de ondas en el cabello, alisamientos, etc., (Ueno *et al.*, 2000), como conservante en la pasta de pescado fabricada en Japón y es un producto residual durante la purificación del agua mediante ozonificación (Himata *et al.*, 1994; Chipman *et al.* 1998).

En 1992, la OMS y la FAO consideraron al KBrO_3 como una sustancia nociva para los humanos debido a que su ingestión prolongada induce vómitos, vértigo, diarreas, metahemoglobinemia, daños renales, etc. (Watanabe *et al.*, 2004). Un estudio mostró que puede producir toxicidad embrionaria en murinos gestantes sometidos a inoculaciones intraperitoneales (Huatuco, 2008), adicionalmente se sabe que presenta efectos mutagénicos (Budavari *et al.*, 1989) y produce daño oxidativo al ADN (Speit *et al.*, 1999; O'Donogue *et al.*, 1999); Hayashi *et al.*, (1988, 1989) y Awogi *et al.*, (1992) demostraron que el KBrO_3 incrementa la frecuencia de micronúcleos (MN) en las células de la médula ósea y en las células de la sangre periférica al ser administrado por vía oral o intraperitoneal con una única dosis.

Por tanto se tiene conocimiento de sus propiedades citotóxicas (Ishidate y Yoshikawa, 1980), mutagénicas (Ishidate *et al.*, 1984) y genotóxicas (Hayashi *et al.*, 1988, 1989), incluyendo la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) produciendo alteraciones como la peroxidación lipídica adicional a la oxidación del ADN (Kasai *et al.*, 1987; Nakae *et al.*, 2002), la peroxidación lipídica se produce debido a la existencia de compuestos sufihidrilos intracelulares como el glutatión reducido (GSH) que reacciona con el anión bromato (BrO_3^-) (Sai *et al.*, 1992; Chipman *et al.*, 1998; Parsons y Chipman, 2000) como parte del metabolismo de detoxificación frente al mecanismo de acción del KBrO_3 dentro del riñón (Watanabe *et al.*, 2001) (Anexos). Se comprobó que una simple administración del KBrO_3 tiene el potencial para activar la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG) que funciona como marcador representativo del daño oxidativo al ADN en riñones de ratas machos; ésta molécula es el promotor más importante de mutaciones y el inductor inicial de tumores provocado por la presencia de KBrO_3 en ratas (Khan *et al.*, 2003).

A nivel fisiológico, Fuji *et al.* (1984) y O'Donoghue *et al.* (1999), mostraron al KBrO_3 como un agente oxidante el cual al ser ingerido es absorbido rápidamente hacia las vías circulatorias (Fuji *et al.*, 1984) sin ninguna modificación química durante su permanencia en el estómago (Parker y Barr, 1951), luego pasa al plasma y a la orina alcanzando una concentración máxima (30% de la dosis administrada por vía oral) en un tiempo relativamente corto (15 min y 60 min respectivamente) y se excreta principalmente a través de la orina (Fuji *et al.*, 1984). Se identificó que este xenobiótico se reduce a bromuro de potasio (KBr), que no produce efectos tóxicos en el organismo, en varios tejidos corporales (riñón, páncreas, estómago, intestino delgado y glóbulos rojos), (Fuji *et al.*, 1984), esta reducción posiblemente es mediada por el GSH (Tanaka *et al.*, 1984;

Watanabe *et al.*, 2002 y 2004), y se produce en una concentración mínima mostrando al KBrO_3 como un compuesto muy estable en el cuerpo (Kutom *et al.*, 1990).

Por lo tanto, se tiene conocimiento de los efectos nocivos inducidos en los mamíferos; sin embargo, hace falta profundizar sobre los efectos que se producen por la presencia del KBrO_3 en el sistema reproductor, específicamente en la gametogénesis masculina y si hay una relación con el daño citotóxico y genotóxico inducido a nivel de médula ósea roja (MOR).

II.2. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO DE *Mus musculus*.

El aparato reproductor masculino de los mamíferos se encuentra formado por los testículos, epidídimos, conductos deferentes y las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) (Anexos). Los testículos son estructuras pares que participan en la producción de espermatozoides y en la síntesis de andrógenos que se encuentran rodeados por la túnica albugínea, el dartos, el cremaster y la piel. Desde la túnica albugínea salen numerosos septos que dividen al testículo en compartimentos piramidales o lobulillos. En *Mus musculus* cada lobulillo está constituido por 15 a 20 túbulos seminíferos (Monesi, 1982).

En los túbulos seminíferos se produce la espermatogénesis que dura, aproximadamente, 35 días en murinos (Franca, 1988). Es un proceso complejo mediante el cual las células germinales primordiales proliferan, reducen su dotación cromosómica a la mitad y se citodiferencian (Oakberg, 1956). El proceso de producción de gametos se inicia en la etapa embrionaria cuando las células germinales colonizan las crestas genitales unos 11 días luego de la fecundación (McLaren y Southee, 1997), la división

mitótica continúa durante 72 h y se detienen al formarse las espermatogonias, esta detención se mantiene hasta momentos después del nacimiento (McLaren, 1984).

La formación de los gametos comprende la propagación mitótica de las espermatogonias formando los espermatocitos primarios (espermatocono I), la multiplicación y la recombinación genética durante la meiosis I formando los espermatocitos secundarios (espermatocono II), la conformación de las espermátides por la meiosis II y la espermiogénesis (Lele & Wolgemuth, 2004). Durante este último periodo las espermátides alteran drásticamente su forma y contenido celular, el contenido citoplasmático disminuye y el ADN se condensa (inicialmente por histonas que luego son reemplazadas por protaminas); se forma el acrosoma que es una estructura esencial para la interacción entre la membrana del ovocito y la del espermatozoide durante la fecundación y finalmente se obtiene un espermatozoide completo (Ehmcke *et al.* 2006; Grzmil, 2008) (Anexos). Las células de Sertoli mantienen a las células espermáticas durante el proceso y la hormona luteinizante también juega un rol importante al inducir la producción de la testosterona por las células de Leydig (Monesi, 1982). Los espermatozoides formados adquieren movimiento durante su tránsito en el epidídimo (Agnes & Akbarsha, 2003).

Adicionalmente, las células germinativas a pesar de estar protegidas por una barrera hematotesticular, con frecuencia son afectadas por una variedad de agentes químicos que interactúan con el ADN (Junqueira & Carneiro, 1996) e interfieren con el equilibrio existente entre la supervivencia y la apoptosis durante la espermatogénesis, generando en consecuencia producciones reducidas de espermatozoides morfológicamente adecuados y fisiológicamente funcionales (Tirado *et al.*, 2003; Ichihara & Pelliniemi, 2007).

II.3. FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS Y LA MEDIDA DE LA INESTABILIDAD CELULAR: CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD *in vivo*.

Durante la división celular el material genético (ADN) se replica y se divide equitativamente dando lugar a dos o cuatro células hijas (división mitótica y meiótica respectivamente), en ambos casos pueden presentarse errores debido a condiciones endógenas como las alteraciones durante la replicación, separación y repartición del ADN o, a las roturas de los cromosomas (Migliori *et al.*, 1999; Ramos-Remus, 2002), y a condiciones exógenas como la presencia de sustancias que pueden reducir la tasa mitótica en diferentes líneas celulares y/o inducir la pérdida cromosómica haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo (Torres y Bugarín *et al.*, 1998; Bonessi *et al.*, 2011). En estas células, cuyo ADN estuvo dañado, se observó un corpúsculo pignótico pequeño (aproximadamente 1/6 del tamaño del núcleo) y se le denominó micronúcleo (MN) (Fenech *et al.*, 1999).

La importancia de las alteraciones durante el desarrollo del ciclo celular y de la formación de MNs en las células reside en las posibles consecuencias adversas que pueden provocar. Se ha relacionado la presencia de MNs con el desarrollo de cáncer (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000).

Los ensayos basados en el análisis de estos cuerpos de cromatina se han difundido ampliamente debido a las ventajas que presentan como la velocidad, sencillez y un costo relativamente bajo (Schmid, 1975), adicionalmente a la naturaleza misma de la formación de los MNs permite emplearlos como biomarcadores del efecto citotóxico, genotóxico, mutagénico y teratogénico en diferentes tipos celulares (Heddle, 1991).

El ensayo citogenético de MNs en eritrocitos policromáticos (EPCs) de la MOR de ratón es uno de los más empleados, acorde con lo concluido por Schmid (1975), la

diferencia de tamaños en los MNs permite distinguir cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico (daño aneugénico) o fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico) (Schmid, 1975), esto fue reafirmado en los trabajos de Afshari (1994) y Miglioriet al. (1996) y una investigación más reciente considera la diferenciación entre tipos de MNs empleando una tinción marcadora del centrómero (Bonassi *et al.*, 2007).

La aplicación de esta evaluación en la línea eritropoyética de la MOR es posible debido a la baja frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos y que en su proceso de maduración pierden el núcleo principal pero no el MN. En los mamíferos la creación de eritroblastos y la maduración en eritrocitos se producen en la médula ósea y requieren de 10 a 12 horas para que un eritroblasto en mitosis muestre la formación de un MN, debido a que la transición de un EPC a un eritrocito normocromático (ENC) demora 20 h, no se esperan incrementos sustanciales en la incidencia de ENCs con MN luego de 24 h de la inoculación (Bonassi *et al.*, 2007). Al usar la tinción convencional por Giemsa, los EPCs (también llamados eritrocitos jóvenes) que han perdido el núcleo, adoptan un color púrpura por la presencia de ARN residual y al pasar a ENCs (que son los eritrocitos maduros) adoptan un color rosa por la pérdida del ARN (Hayashi *et al.*, 1988; Norppa & Falck, 2003).

Los efectos producidos por la presencia de un agente xenobiótico (condiciones exógenas) se pueden analizar de dos maneras: 1) Realizando un análisis citotóxico, que puede llevarse a cabo debido a que durante la maduración desde EPCs hacia ENCs puede bloquear la ruta metabólica alterando la frecuencia normal de estas células lo cual impide la producción adecuada de eritrocitos y 2) realizando un análisis genotóxico, que evidencie si el xenobiótico produjo la formación de un MN dentro de un EPC ya que éste permanece en el citoplasma luego de la expulsión del núcleo principal facilitando la

realización de un contraste analítico de la presencia/ausencia de MNs. El aumento de la frecuencia de MNs en los EPCs de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas (Schmid, 1975; Hayashi *et al*, 1988).

Este estudio cuantifica la relación EPCs/ENCs que permite estimar el daño citotóxico inducido cuando la razón es cercana a cero y el porcentaje de MNs en los EPCs que resultan de las rupturas cromosómicas o la no disyunción por mal funcionamiento del huso mitótico. Al ser aplicado *in vivo* permite estimar el daño en un linaje celular que se encuentre en continua mitosis (Awogi *et al.*, 1992).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. HIPÓTESIS.

- H0: El KBrO_3 produce efectos negativos sobre los parámetros seminales y la línea eritropoyética de la MOR y éstos se encuentran estadísticamente correlacionados.
- H1: El KBrO_3 no produce efectos negativos sobre los parámetros seminales y la línea eritropoyética de la MOR y éstos no se encuentran estadísticamente correlacionados.

III.2. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar los efectos producidos por la presencia del KBrO_3 sobre la línea germinal espermática y la línea eritropoyética de la MOR en *Mus musculus*.

III.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar los efectos del KBrO_3 sobre los parámetros seminales durante un ciclo espermatogénico en ratón (*Mus musculus*).
2. Evaluar el daño citotóxico por la inoculación de KBrO_3 a nivel de médula ósea roja durante un ciclo espermatogénico en ratón (*Mus musculus*).
3. Evaluar el daño genotóxico por la inoculación del KBrO_3 a nivel de médula ósea roja durante un ciclo espermatogénico en ratón (*Mus musculus*).

4. Determinar si existe correlación entre los efectos sobre los parámetros espermáticos y los efectos citotóxicos en la MOR durante un ciclo espermático completo en ratón (*Mus musculus*).
5. Determinar si existe correlación entre los efectos sobre los parámetros espermáticos y los efectos genotóxicos en la MOR durante un ciclo espermático completo en ratón (*Mus musculus*).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MATERIALES.

IV.1.1. Material biológico.

Se seleccionaron 50 ratones machos de la cepa albina Swiss Rockefeller (entre 6 y 8 semanas de edad) obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM bajo condiciones estándar: 1) Fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad, 2) Temperatura entre 25 °C – 27 °C, 3) Humedad relativa: 85%, 4) Alimento balanceado y vitaminado “Bedoce” *ad libitum* y, 5) Agua potable *ad libitum*. Cada uno de los procedimientos que se realizaron en estos animales (mantenimiento en ambiente apropiado, alimentación, establecimiento de las dosis de inoculación, metodología de inoculación y proceso de eutanización) estuvo acorde con los parámetros, recomendaciones y normas de bioética establecidas por diversos comités de ética internacionales (Rodriguez, E., 2007; FONDECYT – CONICYT, 2009; Barrios *et al.*, 2011) y las normas sobre la ética en la investigación del MINSA (2011).

IV.1.2. Equipos.

- Balanza Analítica (Sartorius).
- Balanza Digital (Adam Equipment).
- Pipetas Automáticas (Axigen).

- Autoclave Vertical (Precisión Científica).
- Microscopio Binocular de Campo Claro (Carl Zeiss-Jena).
- Microscopio Estereoscopio (Bausch & Lomb).
- Centrífuga (Presicion Scientific).
- Congeladora Horizontal (-25°C) (International).
- Refrigeradora vertical (GLG).
- Cámara Fotográfica Digital (Panasonic).
- Horno de 0 °C a 300 °C (Adam Equipment).
- Horno Microondas (Samsung).
- Cámara de Bioseguridad (Enviromental).
- Plancha Secadora de Láminas (Precisión Científica).
- Calentador Parabólico (Miray).
- Contómetro Múltiple (Labolar).
- Computadora Portátil (Hewlett-Packard).
- Impresora (Hewlett-Packard).

IV.1.3. Material de vidrio y otros instrumentos.

Tubos de ensayo 10 x 100 mm, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, beakers Pyrex de 10, 25, 50, 100 y 500 mL, probetas de 10, 50 mL, pipetas de 3 mL, viales, estuche de disección de 24 piezas; jeringas de tuberculina, papel lente, pinzas de punta fina (Stainless), Cámara de Neubauer mejorada, pocillos de colección de muestra.

IV.1.4. Reactivos.

Aceite de inmersión (Merck), Ácido acético glacial, Agua desionizada, Agua destilada, Alcohol etílico absoluto, Alcohol corriente de 96º, Citrato de sodio (Sigma), Cloruro de sodio, Fructosa (Sigma), Entellan, Giemsa (Sigma), KBrO_3 (Carlo Erba), Metanol absoluto (Carlo Erba), Resina Entellan, Buffer fosfato salino, Suero albúmina de bovino - BSA (Sigma), Eosina Y (Sigma).

IV.2. METODOLOGÍA.

IV.2.1. Preparación, determinación de la dosis y administración del KBrO_3 .

La dilución del KBrO_3 se realizó utilizando suero fisiológico (Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9% en agua destilada) como vehículo. La dosis letal media (LD_{50}) del KBrO_3 para los ratones de la cepa albina Swiss Rockefeller es de 206,66 mg/kg del peso corporal (PC) (Huatuco, 2008), en este trabajo se utilizó la tercera parte de la LD_{50} para la preparación de la dosis: 68.89 mg/kg PC. Se administró la dosis mediante la inoculación intraperitoneal (IIP) entre las 12 h y las 14 h del día durante los 7, 15, 21 y 35 días establecidos para cada grupo de tratamiento.

IV.2.2. Diseño experimental.

Los 50 ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento y 1 grupo control ($N = 10$) sometidos a inoculaciones intraperitoneales diarias del KBrO_3 a una dosis de 68,89 mg/kg de peso corporal. Los grupos fueron escogidos para realizar

las observaciones a partir de un periodo del desarrollo del ciclo espermatogénico (Figura N° 1):

- Grupo I: 7 días (Análisis a partir de las espermátides tardías).
- Grupo II: 15 días (Análisis a partir de las espermátides tempranas).
- Grupo III: 21 días (Análisis a partir de los espermatoцитos II).
- Grupo IV: 35 días (Análisis a partir de las espermatogonias).
- Grupo V: Control negativo. NaCl 0,9% en agua destilada (el equivalente a 1/100 del peso corporal), 8 días.

Durante el transcurso de los tratamientos se determinaron los pesos corporales diariamente y al finalizar el tiempo de tratamiento, los animales de experimentación ingresaron a tres evaluaciones: 1) Determinación de los pesos de los órganos reproductivos, 2) Evaluación de espermogramas y 3) Evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad celular.

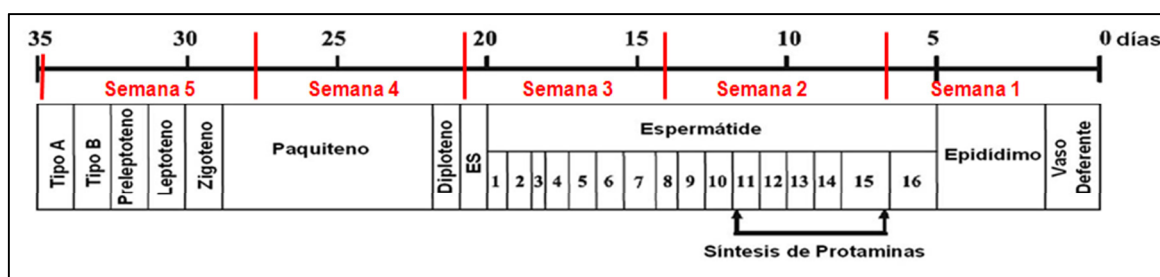


Figura N° 1: Secuencia temporal (en días) y del desarrollo de la espermatogénesis en *Mus musculus* para el establecimiento de los grupos de tratamiento. Tipo A y B: Espermatogonias tipo A y tipo B. ES: Espermatocito secundario (Tomado de Piña y Guzmán *et al.* 2005; traducido por Díaz, 2007).

IV.2.3. Determinación de los pesos de los órganos reproductivos.

Al finalizar el tiempo de los tratamientos, los ratones fueron eutanizados para la disección y aislamiento de los órganos reproductivos, se retiraron los cuerpos grasos utilizando las pinzas y se colocaron los órganos diseccionados en suero fisiológico a 37 °C. Con ayuda del microscopio estereoscópico se separaron los órganos del sistema reproductivo masculino (del lado derecho e izquierdo) y se les colocó por separado en una placa petri con suero fisiológico (NaCl 0,9%) a 37 °C: 1) Testículo, 2) cabeza y cuerpo del epidídimo, 3) cola del epidídimo y 4) conducto deferente; a continuación fueron pesados en la balanza analítica (precisión de 0,001 mg) y se mantuvieron en suero fisiológico a 37° C.

IV.2.4. Evaluación de espermátogramas.

Luego de la determinación de los pesos de los órganos reproductivos se aisló la cola del epidídimo derecho de cada animal de experimentación para trozarlo en 10 mL de suero fisiológico a 37° C; esta mezcla fue analizada mediante los espermátogramas según los parámetros aprobados por la OMS (2010) y con el protocolo modificado por el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Departamento de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

IV.2.4.1. Examen microscópico inicial.

IV.2.4.1.1. Análisis de la motilidad espermática.

Se colocó sobre una lámina porta objeto 10 μ L de la dilución espermática (la cola del epidídimo trozado en 10 mL de suero fisiológico) a 37 °C y se cubrió con una laminilla. Se utilizó un microscopio de campo claro y se procedió a contar 100 espermatozoides en un mínimo de 5 campos y con un aumento de 400X, los resultados se expresaron en porcentajes y fueron clasificados acorde con las siguientes categorías:

- Movilidad progresiva (MP): Espermatozoides con movimiento en línea recta o circular sin tomar en cuenta la velocidad.
- Movilidad no progresiva (MNP): Espermatozoides con movimiento de la cola pero sin desplazamiento.
- Inmovilidad o no móvil (NM): Ausencia absoluta de movimiento.

IV.2.4.1.2. Análisis de la vitalidad espermática.

El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó mediante el uso de 5 μ L de eosina Y al 0,5% en agua destilada a 37 °C sobre 5 μ L de la dilución espermática a 37 °C. Se mantuvo en reposo durante 1 minuto y se procedió a contar 100 espermatozoides en un mínimo de 5 campos y con un aumento de 400X, se diferenciaron los espermatozoides vivos (no teñidos), de los muertos (teñidos) y los resultados se expresaron en porcentajes.

IV.2.4.2. Examen microscópico detallado.

IV.2.4.2.1. Análisis de la morfología espermática.

La determinación de la morfología espermática fue realizada colocando 5 μ L de la dilución espermática a 37 °C con 5 μ L de eosina Y al 0,5% en agua destilada a 37 °C sobre una lámina portaobjeto, se hizo un conteo de 100 espermatozoides vivos analizando la morfología de: La cabeza, pieza intermedia y cola. Se consideró como espermatozoide normal aquel cuya cabeza sea de contorno regular en la punta y de base plana, con la inserción de la pieza intermedia en el centro de la cabeza y con la presencia de una única cola sin torsión, dobleces o fracturas. Se registró el número de espermatozoides anormales para cada estructura (OMS, 2010).

IV.2.4.2.2. Concentración espermática.

El conteo espermático se realizó con el método del hemocitómetro usando la cámara de Neubauer mejorada. Se cargó 10 μ L de la dilución espermática y 990 μ L de agua destilada, luego se colocó 10 μ L de esta nueva dilución en el centro de la cámara, se dejó reposar 5 minutos y se contó los 25 cuadrados. Al observar un espermatozoide sobre la línea divisoria vertical entre dos cuadrados, se le consideró como ocupante del cuadrado izquierdo al analizado; de encontrarse un espermatozoide sobre la línea divisoria horizontal se le consideró como ocupante del cuadrado inferior, el resultado se expresó en millones de espermatozoides por mililitro (OMS, 2010).

IV.2.4.2.3. Test hipo-osmótico (test HOST) para evaluar la integridad de la membrana espermática.

Se preparó la solución hipo-osmótica mezclando 0,735 g de citrato de sodio (Sigma) y 1,351 g de fructosa (Sigma) en 100 mL de agua destilada. Se colocó en una lámina portaobjeto 5 µL de la dilución espermática con 5 µL de la solución hipo-osmótica a 37 °C, se cubrió con una laminilla cubreobjeto y se dejó reposar durante 2 h a 37° C. Terminado el tiempo de reposo se contó 100 espermatozoides diferenciando aquellos que presentaron la cola enrollada o curva (membrana normal) de los que presentaron la cola recta (membrana alterada).

IV.2.5. Evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad.

Acorde con la metodología descrita por Alvis (2010) para el test de MNs en células de la MOR, de los ratones eutanizados para la evaluación por espermatogramas se obtuvo las MORs a partir del fémur derecho con ayuda de las jeringas de tuberculina, las que contenían 1 mL de buffer fosfato (PBS) a una concentración de 1X suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) al 5%. Se aislaron las células formes del plasma sanguíneo mediante centrifugación (1500 rpm – 3 min) y se realizaron dos frotis para cada individuo perteneciente a los grupos de tratamiento (para el Grupo V solo se realizó un frotis). Las láminas fueron mantenidas a 37 °C durante 45 min y luego sumergidas en metanol absoluto a 4 °C durante 12 min. Finalmente teñidas con solución Giemsa al 2% durante 17 min; se realizaron lavados con agua destilada y se dejaron las láminas secando para sellarlas con Entellan y se almacenaron hasta el momento de la lectura para obtener los índices de citotoxicidad y de genotoxicidad.

IV.2.5.1. Índice de citotoxicidad.

Se realizó un conteo de 2000 células en el microscopio de campo claro con un aumento de 400X utilizando un contómetro múltiple. Se consideró solamente a los EPCs (células púrpuras) y a los ENCs (células rosadas). La obtención del índice fue mediante la fórmula:

$$Citotoxicidad = \frac{EPCs}{ENCs}$$

IV.2.5.2. Índice de genotoxicidad.

Se realizó un conteo de 2000 EPCs por cada lámina y se registró el número de células que presentaron Mns como índice del daño genotóxico.

IV.2.6. Análisis estadístico.

Los valores obtenidos mediante los espermogramas y los conteos de EPCs y ENCs en la MOR fueron tabulados adecuadamente en el software Excel 2010 para ser ingresados y procesados en el paquete estadístico SPSS versión 20.0. En los resultados estos datos son mostrados como media \pm desviación estándar (DE). Se determinó el tipo de distribución de los datos (prueba de Kolmogorov–Smirnov), contrastados mediante ANOVA, a través de la prueba de Levene (para evaluar homogeneidad de varianzas), y la prueba de Tukey para los datos paramétricos (pesos, morfología, motilidad, vitalidad, integridad espermática, conteo espermático, índice de citotoxicidad y genotoxicidad), se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Adicionalmente se realizó, para cada tratamiento, una correlación a través del estadístico R de Pearson para obtener los valores p entre los parámetros seminales y los índices de citotoxicidad y genotoxicidad en la MOR. Se usó un nivel de significancia de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

V.1. DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS Y DE LA HOMOGENEIDAD DE LAS VARIANZAS.

Se utilizó la prueba de Kolmogorov – Smirnov (estadístico Z de K-S) para estimar la distribución de los datos, ninguna de las variables mostró un valor para Z inferior a 0,05 por tanto los datos presentaron una distribución normal. A través de la prueba de Levene se estimó la homogeneidad de las varianzas tomando como valor de significancia 0,05, los datos mostraron varianzas homogéneas para todas las variables ($p > 0,05$), lo cual permitió realizar el ANOVA y la evaluación post hoc de Tukey, los valores obtenidos para ambas pruebas se pueden apreciar en la Tabla N° 1.

V.2. ANÁLISIS DE LOS PESOS CORPORALES Y DE LOS PESOS DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS.

Las variaciones de los PCs mostraron diferencias para los tratamientos de 15, 21 y 35 días (Grupos II, III y IV respectivamente) (Tabla N° 2 y Figura N° 2); sin embargo, con el transcurso de los días de tratamiento, el peso de los órganos reproductivos disminuyó significativamente a partir del día 21 (Grupo III), los testículos mostraron una reducción significativa con $104,2 \pm 0,9$ mg frente a los $104,4 \pm 3,0$ mg del CN; los conductos deferentes con $10,1 \pm 0,3$ mg frente a los $10,7 \pm 0,3$ mg del CN; los epidídimos con la porción final seccionada (cola) tuvieron $21,4 \pm 0,3$ mg frente a los $22,2 \pm 0,8$ mg del CN y las colas de los epidídimos tuvieron $11,8 \pm 0,3$ mg frente a los $12,3 \pm 0,4$ mg del CN (Tabla N° 2 y Figuras N° 3 y 4).

Tabla N° 1: Valores obtenidos para el estadístico Z de K-S y la prueba de Levene mediante el paquete estadístico SPSS 20.0. Esp.: Espermatozoide.

	Sig. Del Z de K-S	Sig. De Levene
Variación del PC	0,3097	0,284
Peso de testículo	0,5303	0,140
Peso de conducto deferente	0,6818	0,592
Peso de la cabeza y cuerpo del epidídimo	0,6064	0,102
Peso de cola del epidídimo	0,6546	0,836
Esp. Móviles progresivos	0,2201	0,540
Esp. Móviles no progresivos	0,0541	0,085
Esp. No móviles	0,8949	0,708
Esp. Vivos	0,2874	0,420
Integridad de membrana normal	0,2874	0,420
Morfología normal	0,2910	0,618
Anomalías de cabeza	0,2910	0,618
Anomalías de pieza intermedia	0,1119	0,276
Anomalías de cola	0,2990	0,374
Conteo espermático	0,0763	0,790
Eritrocitos policromáticos	0,1409	0,713
Índice de citotoxicidad	0,6168	0,859
Índice de genotoxicidad	0,3097	0,098

* Diferencia significativa para $p < 0,05$.

Tabla N° 2: PCs y pesos de órganos reproductivos de los ratones tratados con KBrO_3

A	Variación PC (g)	Peso-testículo (g)	Peso-Cond. Def. (g)	Peso-C+C epid. (g)	Peso-cola epid. (g)
Grupo I	3,53 ± 0,28	0,1042 ± 0,009	0,0109 ± 0,0002	0,0220 ± 0,0004	0,0122 ± 0,0004
Grupo II	3,94 ± 0,27	0,1028 ± 0,007	0,0107 ± 0,0004	0,0217 ± 0,0004	0,0119 ± 0,0003
Grupo III	4,18 ± 0,34	0,1007 ± 0,007	0,0101 ± 0,0003	0,0214 ± 0,0003	0,0118 ± 0,0003
Grupo IV	4,90 ± 0,44	0,0977 ± 0,009	0,0962 ± 0,0039	0,0206 ± 0,0003	0,0117 ± 0,0003
Grupo V	3,50 ± 0, 21	0,1044 ± 0,003	0,0107 ± 0,0029	0,0222 ± 0,0008	0,0123 ± 0,0004
B	Variación PC	Peso-testículo	Peso-Cond. Def.	Peso-C+C epid.	Peso-cola epid.
Grupo I	1,000	0,998	0,300	0,872	0,905
Grupo II	0,27	0,131	1,000	0,197	0,109
Grupo III	<0,001	<0,001	0,007	0,005	0,015
Grupo IV	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,005

Cond. Def: Conducto deferente, C+C epid.: Cabeza y cola del epidídimo, cola epid.: Cola del epidídimo.

A) Valores mostrados como media ± DE. **B)** Valores *p* para análisis de la significancia estadística en comparación con el control negativo (Grupo V: CN). * Diferencia significativa para $p < 0,05$

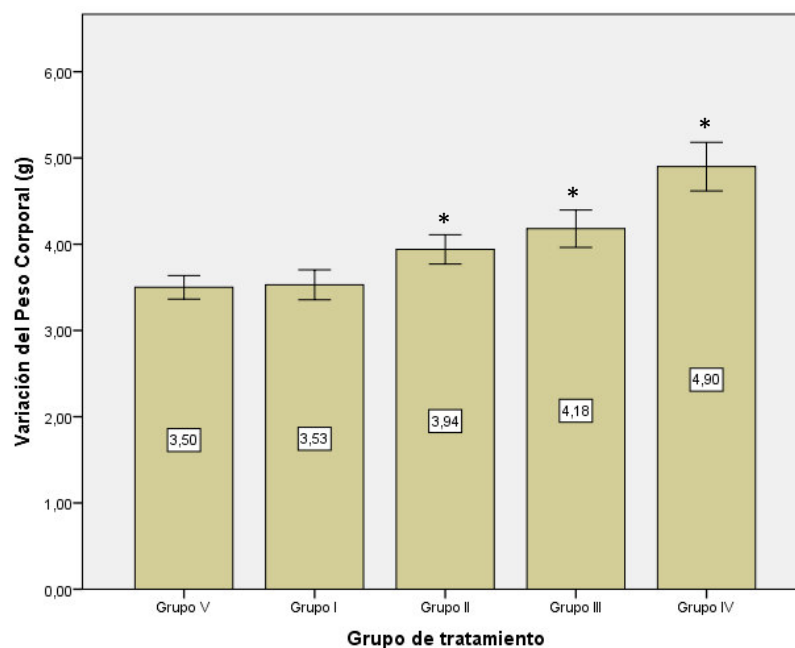


Figura N° 2: Variación del PC en gramos de los ratones en los grupos de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. Se observó un incremento significativo del peso corporal a partir del Grupo II debido al crecimiento de los animales de experimentación.

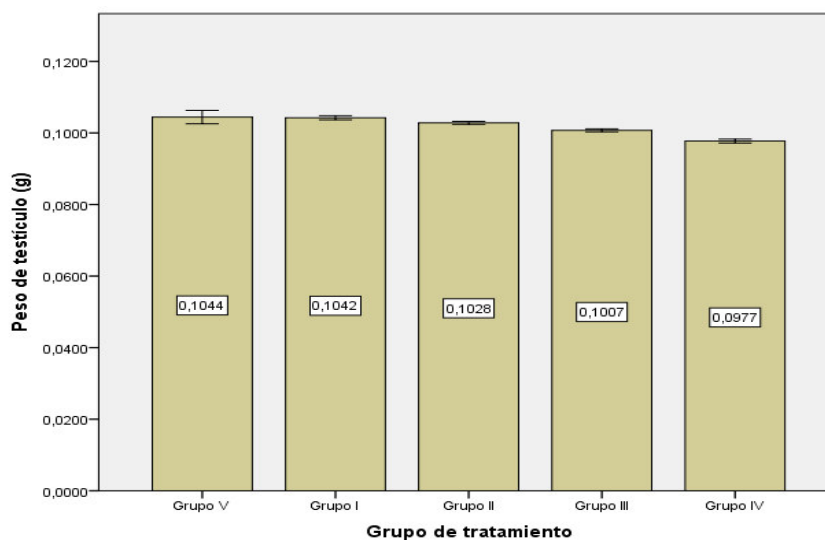


Figura N° 3: Peso del testículo (g) de los animales tratados con KBrO_3 (Grupo I, II, III y IV) y del CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. A pesar del crecimiento de los animales de experimentación, los pesos de los testículos de los ratones pertenecientes a los Grupos III y IV mostraron una disminución no significativa que evidenció de forma indirecta una reducción en la población de espermatozoides.

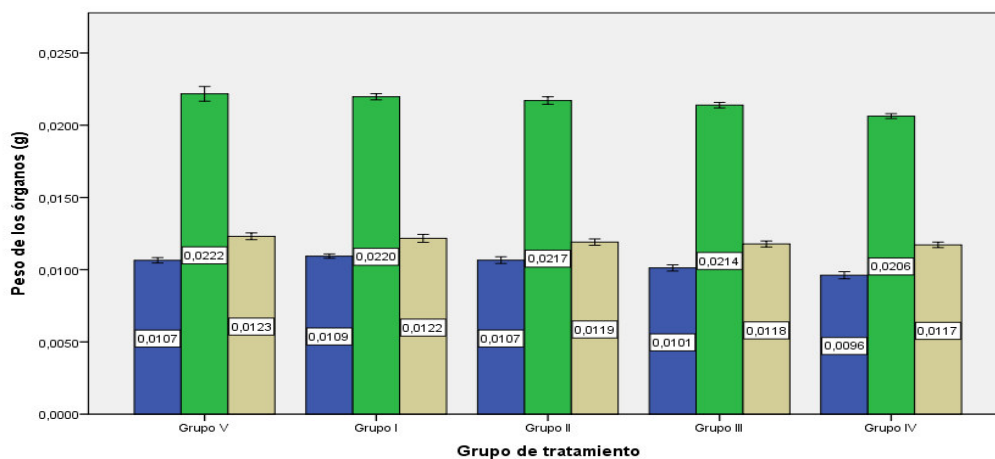


Figura N° 4: Peso del conducto deferente (azul), cabeza y cuerpo del epidídimo (verde) y de la cola del epidídimo (gris) de los animales tratados con KBrO_3 (Grupo I, II, III y IV) y del CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. En los Grupos III y IV, los epidídimos y los conductos deferentes presentaron una disminución no significativa de sus pesos a pesar del crecimiento corporal.

V.3. EVALUACIÓN DE LOS ESPERMATOGRAMAS.

V.3.1. Motilidad

Los espermatoogramas mostraron que el porcentaje de espermatozoides MP disminuyó significativamente en el Grupo II ($51,70 \pm 3,34$), en Grupo III ($47,10 \pm 3,34$) y en el Grupo IV ($45,80 \pm 2,57$), frente al CN ($58,00 \pm 1,94$); el porcentaje de espermatozoides MNP se redujo significativamente en los Grupos I y IV ($17,00 \pm 2,16$ y $17,00 \pm 1,89$ respectivamente) frente a los $22,70 \pm 5,08$ espermatozoides MNP del CN; el porcentaje de espermatozoides NM se incrementó en los Grupos I, II, III y IV, ($26,50 \pm 3,69$; $29,30 \pm 4,30$; $32,20 \pm 4,16$; $37,20 \pm 3,68$ respectivamente) frente a los $19,30 \pm 4,45$ espermatozoides del CN (Tabla N° 3 y Figura N° 5).

V.3.2. Vitalidad

El porcentaje de la vitalidad espermática disminuyó significativamente desde el Grupo I ($68,90 \pm 2,33$ vs. $75,50 \pm 1,90$ del CN) (Tabla N° 3 y Figura N° 6), el porcentaje de espermatozoides con membrana espermática normal (HOST positivo) también tuvo una disminución significativa desde el Grupo I ($49,40 \pm 2,50$ vs. $63,90 \pm 1,90$ del CN) (Tabla N° 3 y Figura N° 7). La morfología espermática también se vio alterada significativamente en el Grupo II, principalmente a nivel de región cefálica ($3,60 \pm 0,69$ vs. $2,30 \pm 0,82$ del CN), en el Grupo III se aprecian diferencias significativas para la pieza intermedia ($2,60 \pm 0,96$ vs. $0,40 \pm 0,69$ del CN) y la cola ($2,50 \pm 0,70$ vs. $0,90 \pm 0,73$ del CN) (Tabla N° 4).

5.3.3. Conteo espermático

Finalmente, la concentración espermática también mostró diferencias significativas en el Grupo II ($49,80 \pm 3,62$ millones de espermatozoides), Grupo III ($45,80 \pm 3,26$ millones) y Grupo IV ($36,50 \pm 3,66$ millones) frente a los $55,60 \pm 2,84$ millones de espermatozoides del CN (Tabla N° 5 y Figura N° 8).

Tabla N° 3: Porcentajes de los valores espermáticos correspondientes a la movilidad, vitalidad e integridad de la membrana espermática para los diferentes grupos de tratamiento.

A	Movilidad			Vitalidad	Membrana normal
	MP	MNP	NM	espermática	(Host +)
Grupo I	$56,50 \pm 3,17$	$17,00 \pm 2,16^*$	$26,50 \pm 3,69^*$	$68,90 \pm 2,33^*$	$49,40 \pm 2,50^*$
Grupo II	$51,70 \pm 3,34^*$	$19,00 \pm 3,18$	$29,30 \pm 4,30^*$	$55,60 \pm 2,06^*$	$46,00 \pm 2,70^*$
Grupo III	$47,10 \pm 3,64^*$	$20,70 \pm 2,06$	$32,20 \pm 4,16^*$	$46,30 \pm 1,76^*$	$40,60 \pm 2,36^*$
Grupo IV	$45,80 \pm 2,57^*$	$17,00 \pm 1,89^*$	$37,20 \pm 3,68^*$	$40,80 \pm 1,39^*$	$37,80 \pm 1,68^*$
Grupo V	$58,00 \pm 1,94$	$22,70 \pm 5,08$	$19,30 \pm 4,45$	$75,50 \pm 1,90$	$63,90 \pm 1,90$
B	Movilidad	Vitalidad	Membrana normal	Vitalidad	Membrana normal
	MP	MNP	NM	espermática	(Host +)
Grupo I	0,795	$0,002^*$	$0,002^*$	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo II	$<0,001^*$	0,077	$<0,001^*$	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo III	$<0,001^*$	0,608	$<0,001^*$	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo IV	$<0,001^*$	$0,002^*$	$<0,001^*$	$<0,001^*$	$<0,001^*$

A) Valores mostrados como media \pm DE. **B)** Valores p para análisis de la significancia estadística en comparación con el CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$.

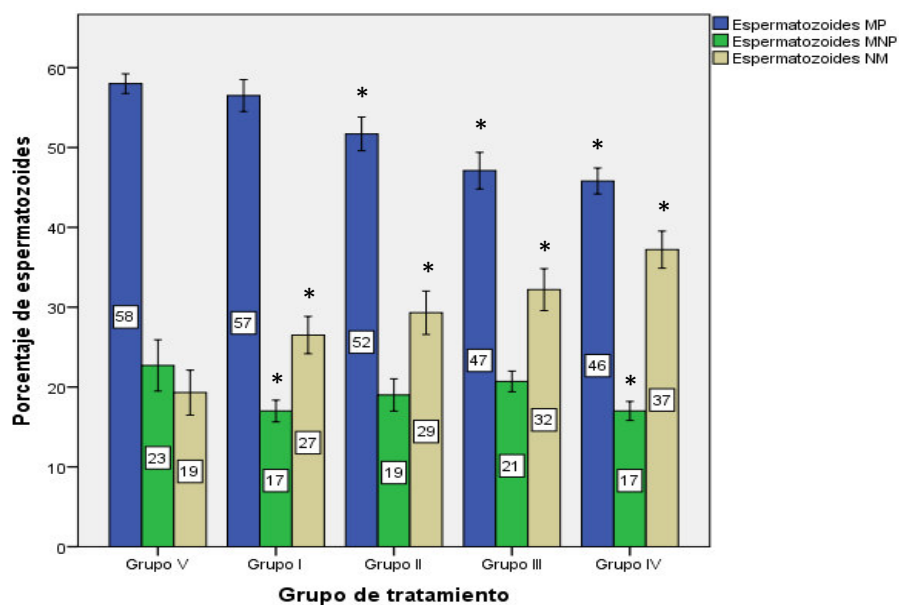


Figura N° 5: Porcentajes de los valores espermáticos para la motilidad en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. Se encontró una reducción significativa de los espermatozoides MP a partir del Grupo II y el porcentaje de espermatozoides NM se incrementó a partir del Grupo I.

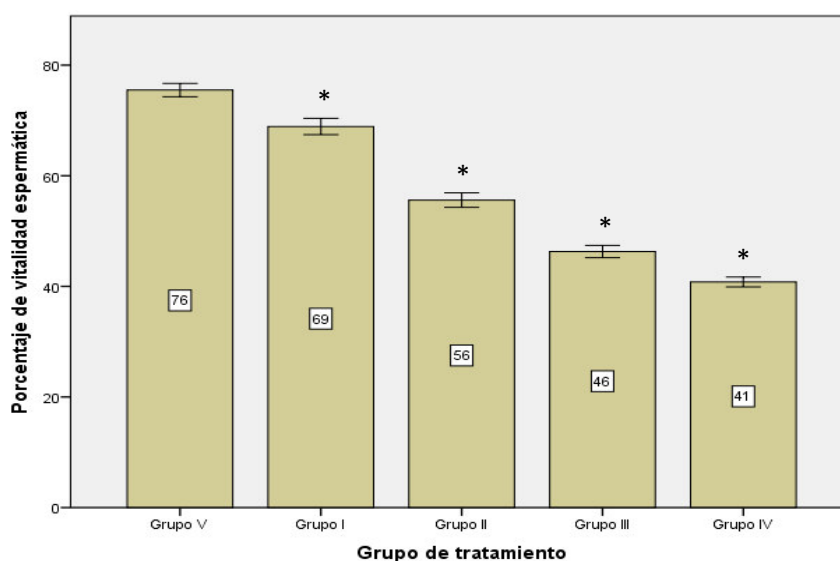


Figura N° 6: Porcentajes de los valores espermáticos para la vitalidad espermática en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. Se observó que la vitalidad espermática se redujo significativamente a partir del Grupo I aumentando la mortalidad conforme se incrementó el tiempo de exposición en los grupos restantes.

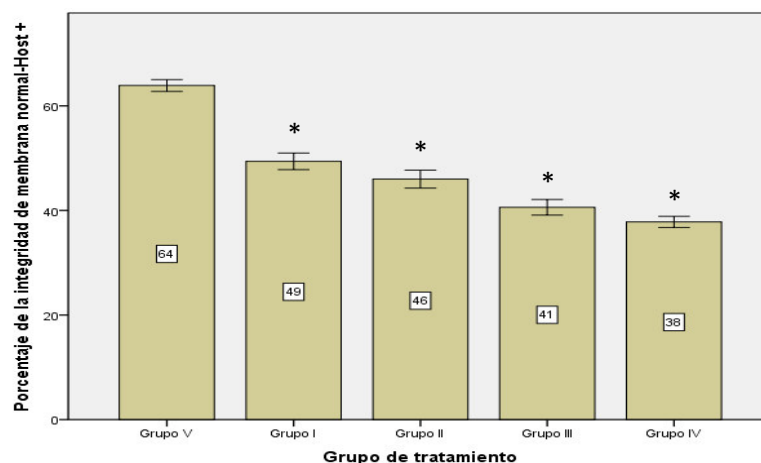


Figura N° 7: Porcentajes de los valores espermáticos para la integridad de membrana normal en cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. Se observó que el porcentaje de espermatozoides con membrana normal se redujeron significativamente desde el Grupo I, este efecto fue acumulativo en los demás grupos de tratamiento.

Tabla N° 4: Porcentajes de los valores espermáticos correspondientes a la morfología espermática para los diferentes grupos de tratamiento (A.: Anomalías).

A	Normal	A. Cabeza	A. Pieza intermedia	A. Cola
Grupo I	96,90±1,10	1,50±0,70	0,70±0,82	0,90±0,87
Grupo II	93,30±1,63*	3,60±0,69*	1,40±0,84	1,70±0,94
Grupo III	90,60±1,57*	4,30±0,82*	2,60±0,96*	2,50±0,70*
Grupo IV	87,50±1,35*	5,30±1,25*	4,10±0,87*	3,10±0,73*
Grupo V	96,40±0,69	2,30±0,82	0,40±0,69	0,90±0,73
B	Normal	A. Cabeza	A. Pieza intermedia	A. Cola
Grupo I	0,914	0,272	0,931	1,000
Grupo II	<0,001*	0,016*	0,079	0,192
Grupo III	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,001*
Grupo IV	<0,001*	<0,0010*	<0,001*	<0,001*

A) Valores mostrados como media \pm DE. **B)** Valores p para análisis de la significancia estadística en comparación con el CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$.

Tabla N° 5: Concentración espermática en millones/mL obtenido por los espermátogramas aplicados a cada grupo de tratamiento.

Tratamiento	Concentración espermática	Sig.
	(*10 ⁶)	
Grupo I	52,10±3,99	0,184
Grupo II	49,80±3,62*	0,005*
Grupo III	45,80±3,26*	<0,001*
Grupo IV	36,50±3,66*	<0,001*
Grupo V	55,60±2,84	

Valores mostrados como media ± DE. Sig.: Valores *p* para análisis de la significancia estadística en comparación con el CN (Grupo V). * Diferencia significativa para *p*<0,05.

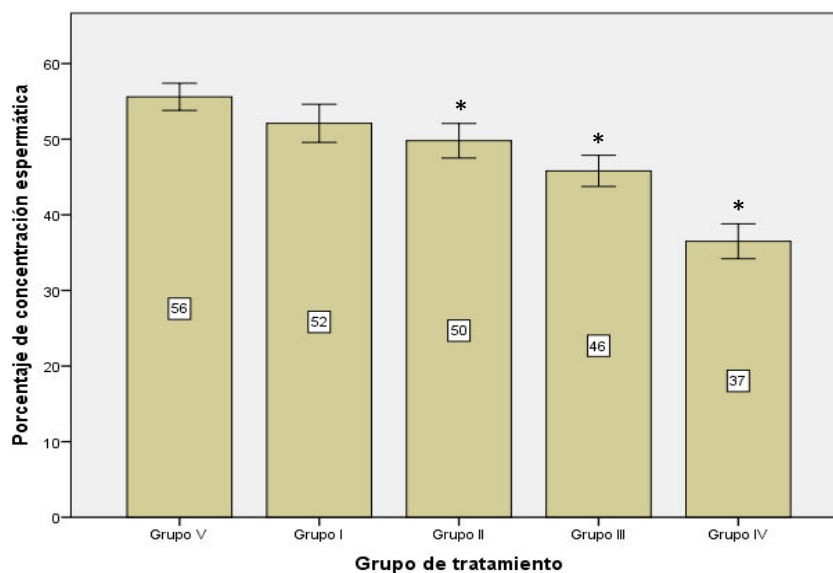


Figura N° 8: Concentración espermática en millones/mL obtenido a partir de los espermátogramas para cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para *p*<0,05 frente al CN. Se encontró una disminución significativa de la concentración espermática a partir del Grupo II, el efecto fue acumulativo conforme se incrementaba el tiempo de exposición en los grupos restantes.

V.4. CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.

El índice de citotoxicidad medular fue significativo desde el Grupo I ($0,6479 \pm 0,0153$ vs. $0,9627 \pm 0,0102$ del CN), este valor se mantuvo relativamente estable para los Grupos II, III y IV (Tabla N° 6 y Figura N° 9). La genotoxicidad de la MOR fue significativa para todos los grupos de tratamiento, el Grupo I mostró $16,05 \pm 1,87$ EPCs con MN, y se incrementó conforme aumentó el número de días de tratamiento: $19,83 \pm 1,94$ para el Grupo II, $25,80 \pm 1,64$ para el Grupo III y $25,80 \pm 1,64$ para el Grupo IV, frente a los $3,20 \pm 1,03$ del CN (Tabla N° 6 y Figura N° 10).

Tabla N° 6: Índices de citotoxicidad y genotoxicidad (evaluada como EPC con Mn) observada para cada grupo de tratamiento.

A	Citotoxicidad	EPC con Mn
Grupo I	$0,6479 \pm 0,0153^*$	$16,05 \pm 1,87^*$
Grupo II	$0,6420 \pm 0,0128^*$	$19,83 \pm 1,94^*$
Grupo III	$0,6275 \pm 0,0185^*$	$25,80 \pm 1,64^*$
Grupo IV	$0,6115 \pm 0,0146^*$	$26,45 \pm 2,14^*$
Grupo V	$0,9627 \pm 0,0102$	$3,20 \pm 1,03$
B	Citotoxicidad	EPC con Mn
Grupo I	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo II	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo III	$<0,001^*$	$<0,001^*$
Grupo IV	$<0,001^*$	$<0,001^*$

A) Valores mostrados como media \pm DE. B) Valores p para análisis de la significancia estadística en comparación con el CN (Grupo V). * Diferencia significativa para $p < 0,05$.

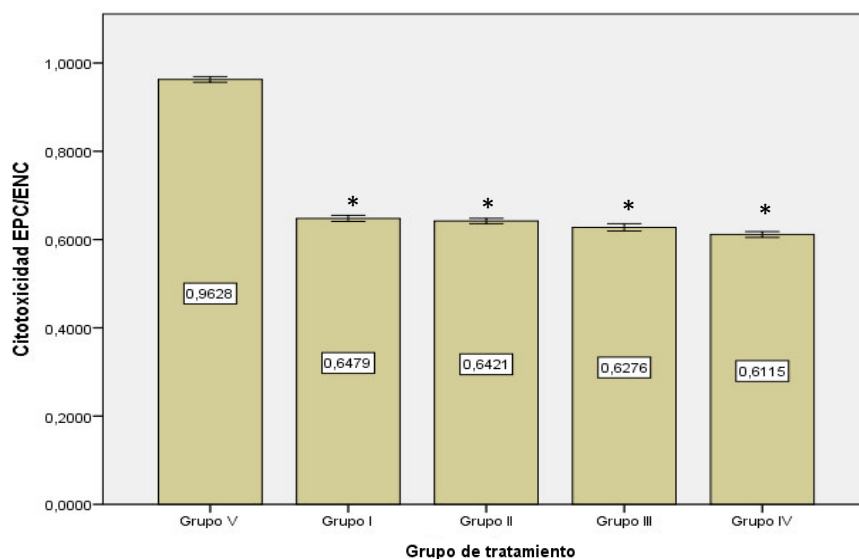


Figura N° 9: Índice de citotoxicidad obtenido a partir de la relación EPC/ENC de la MOR por cada grupo de tratamiento. * Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. El daño citotóxico se pudo evidenciar desde el Grupo I; sin embargo no tuvo un efecto acumulativo pues los valores se mantuvieron constantes en los grupos restantes.

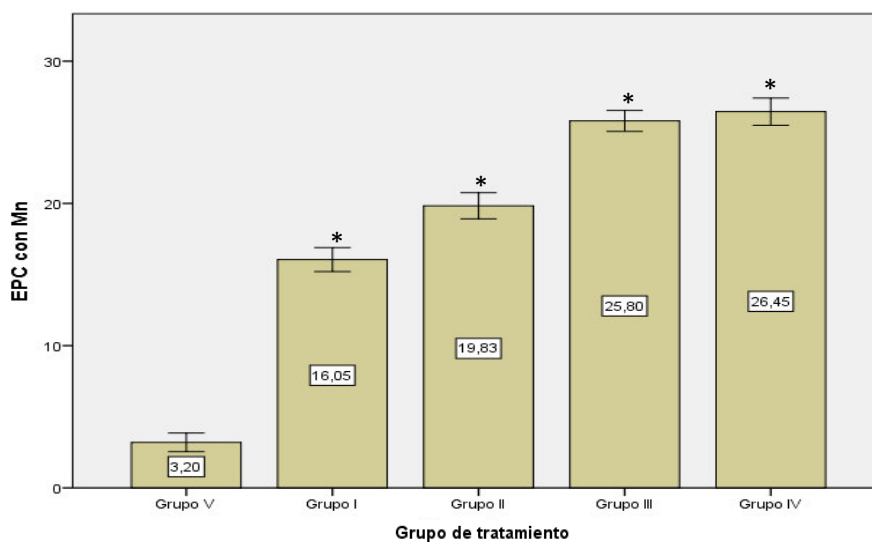


Figura N° 10: Índice de genotoxicidad por formación de MNs en los EPCs de la MOR por cada grupo de tratamiento.* Diferencia significativa para $p < 0,05$ frente al CN. El daño genotóxico se pudo apreciar desde el Grupo I y su efecto fue acumulativo en los grupos restantes.

V.5. CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS SEMINALES Y LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD EN LA MOR.

Al tratarse de variables paramétricas cuantitativas se optó por realizar la correlación mediante el estadístico R de Pearson que permite medir la relación lineal entre los valores seminales y los valores de toxicidad medular. Se puede observar en la Tabla N° 7 que la mayoría de los valores de R se encuentran en un rango próximo a cero indicando que no hay una correlación apreciable entre el daño producido en la línea germinal masculina y la línea eritropoyética de la MOR, sin embargo pueden apreciarse excepciones: 1) En el Grupo II existe correlación positiva entre la citotoxicidad y los espermatozoides con membrana normal (R de 0,780), 2) en el Grupo III se aprecia una correlación negativa entre la genotoxicidad medular y el número de espermatozoides vivos (R de -0,707) y 3) en el Grupo V (CN) hay correlación positiva entre la citotoxicidad y el número de espermatozoides MNP (0,699), NM (-0,875) y vivos (R de 0,652).

Tabla N° 7: Correlación de Pearson y valores p de significancia bilateral entre los parámetros seminales y los índices de citotoxicidad y genotoxicidad en MOR

	Parámetros seminales	Citotoxicidad		Genotoxicidad	
		R de Pearson	Sig (Bilat)	R de Pearson	Sig (Bilat)
Grupo I	MP	-0,377	0,282	-0,104	0,774
	MNP	-0,358	0,309	0,102	0,779
	NM	0,534	0,112	0,030	0,935
	Vitalidad	0,045	0,902	-0,079	0,828
	Membrana normal (Host +)	-0,059	0,871	-0,382	0,276
	Morfología normal	-0,292	0,413	-0,167	0,644
	Concentración espermática	-0,440	0,203	0,139	0,703
Grupo II	MP	-0,198	0,584	0,321	0,366
	MNP	0,355	0,315	-0,020	0,957
	NM	-0,110	0,761	-0,235	0,514
	Vitalidad	-0,228	0,526	-0,122	0,737
	Membrana normal (Host +)	0,780	0,008*	0,279	0,435
	Morfología normal	-0,571	0,085	-0,346	0,327
	Concentración espermática	0,025	0,946	0,575	0,082
Grupo III	MP	0,172	0,636	-0,017	0,964
	MNP	-0,160	0,658	0,120	0,741
	NM	-0,071	0,847	-0,045	0,902
	Vitalidad	-0,260	0,468	-0,707	0,022*
	Membrana normal (Host +)	0,408	0,241	0,158	0,663
	Morfología normal	0,071	0,846	-0,144	0,692
	Concentración espermática	-0,062	0,864	0,016	0,964
	MP	-0,072	0,844	-0,182	0,615
	MNP	-0,191	0,596	-0,297	0,405

Grupo IV	NM	0,148	0,682	0,280	0,434
	Vitalidad	0,212	0,556	0,357	0,312
	Membrana normal (Host +)	0,294	0,410	-0,610	0,061
	Morfología normal	0,223	0,535	0,507	0,134
	Concentración espermática	0,258	0,472	0,494	0,147
Grupo V	MP	0,177	0,624	-0,332	0,348
	MNP	0,699	0,025*	0,097	0,789
	NM	-0,875	0,001*	0,034	0,926
	Vitalidad	0,652	0,041*	-0,057	0,877
	Membrana normal (Host +)	0,280	0,433	-0,048	0,895
	Morfología normal	-0,478	0,163	-0,277	0,439
	Concentración espermática	0,620	0,056	-0,046	0,901

*Significancia estadística para $p < 0,05$

VI. DISCUSIÓN

El modelo biológico de ratón reúne muchas de las características necesarias para realizar investigaciones sobre los efectos *in vivo* de xenobióticos en el organismo de los mamíferos (velocidad en su reproducción, fácil manipulación, fisiología similar a la humana, bajo costo de mantenimiento y ciclo reproductivo corto). En este trabajo se utilizó el KBrO_3 como xenobiótico debido a que actualmente se sigue empleando en procesos destinados al consumo humano (Budavari *et al.*, 1989; Chipman *et al.*, 1998; Ribotta *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 2000). Se conocen varios de los efectos tóxicos y mutagénicos en diferentes líneas celulares y en diferentes tipos de tejidos (Nakae *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004; Gonzales *et al.*, 2007; Huatuco, 2008). Reportes previos sugieren que los efectos tóxicos son producidos como resultado del incremento de los niveles de peróxido lipídico, el cual junto con la generación de ROS, induce la carcinogénesis y el daño oxidativo al ADN (Suzuki *et al.*, 1997; Wolf *et al.* 1998).

En relación a la metodología, la dosis elegida correspondió a la tercera parte de la LD_{50} (Gonzales *et al.*, 2007; Huatuco, 2008) con la finalidad de evitar daños letales a los animales de investigación, debido a que los tratamientos fueron extensos con inoculaciones diarias. El control negativo estuvo conformado por un único grupo de 10 ratones sometidos a inoculaciones de suero fisiológico por 8 días para disminuir drásticamente el número total de animales de laboratorio sometidos a la manipulación y estrés de las inyecciones diarias. Existen reportes en los cuales la inoculación del vehículo (sea PBS, H_2O destilada o suero fisiológico) no altera los valores espermáticos en los individuos control después de 5 semanas de inoculaciones diarias (Namasivayam *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2009; Drummond *et al.*, 2012). Ninguno de los animales de experimentación murió en el transcurso de los tratamientos y durante todo el tiempo que

duró la parte experimental se siguieron los parámetros de bioética, recomendaciones y normas establecidas por diversos comités de ética internacionales (Rodriguez, E., 2007; FONDECYT – CONICYT, 2009; Barrios *et al.*, 2011) y las normas sobre la ética en la investigación del MINSA (2011).

Las líneas celulares evaluadas fueron la línea germinal espermática en 4 momentos del ciclo (descritos en la parte metodológica) y la línea eritropoyética de la MOR, ambas presentan una tasa de división celular elevada que permite evidenciar efectos perjudiciales durante el ciclo celular (Bonassi *et al.*, 2007). Los valores obtenidos para todas las variables mostraron una distribución normal (prueba de Levene) y varianzas homogéneas (prueba de Komogorov Smirnov) permitiendo realizar un análisis estadístico cuantitativo detallado (Tabla N° 1).

Los incrementos en los PCs (Figura N° 1) se explican debido al crecimiento de los animales de investigación durante los 7, 15, 21 y 35 días de tratamiento, sin embargo los pesos de los testículos, conductos deferentes y epidídimos mostraron una disminución no significativa en las muestras observadas a los 21 y 35 días mostrando de forma indirecta que la población de espermatozoides disminuye (Tabla N° 2 y Figuras N° 2 y 3), esto fue confirmado posteriormente por los espermátogramas.

Acorde con lo expuesto en el marco teórico, la línea germinal espermática inicia la espermatogénesis con células llamadas espermatogonias (diploides) que luego de una división mitótica forman a los espermatocitos primarios, éstas nuevas células inician la primera división meiótica dando origen a los espermatocitos secundarios (haploides) que inmediatamente realizan la segunda división meiótica para formar a las espermátides (tempranas y posteriormente las tardías), estas últimas realizan la espermiogénesis (modificaciones celulares postranscripcionales) para formar espermatozoides funcionales (Lele y Wolgemuth, 2004).

Al centrar el análisis en el último periodo de la espermiogénesis, es decir desde la espermatide tardía hasta la formación completa de un espermatozoide (Grupo I) se aprecia que el porcentaje de espermatozoides MP se mantiene constante y que el de espermatozoides MNP ha disminuido ($17,00 \pm 2,16$ vs. $22,70 \pm 5,08$ del CN) incrementando significativamente el porcentaje de espermatozoides NM ($26,50 \pm 3,69$ vs. $19,30 \pm 4,45$ del CN) (Tabla N° 3 y Figura N° 4). La vitalidad espermática también se vio afectada por la reducción significativa del porcentaje de espermatozoides vivos ($68,90 \pm 2,33$ vs. $75,50 \pm 1,90$) (Tabla N° 3 y Figura N° 5) y el porcentaje de espermatozoides con membrana espermática normal también se vio significativamente reducido ($49,40 \pm 2,50$ vs. $63,90 \pm 1,90$) (Tabla N° 3 y Figura N° 6). En consecuencia los primeros efectos observados se centran en la capacidad de movimiento espermático, reducción de la vitalidad y de la permeabilidad de la membrana espermática, es necesario recordar que en este periodo los microtúbulos son los encargados de formar al flagelo espermático cuya asimetría específica es necesaria para poder realizar el movimiento característico de esta célula (Inaba, 2003).

La espermiogénesis completa corresponde a la maduración desde las espermatides tempranas hasta la conformación final de los espermatozoides, en ratones dura aproximadamente 15 días y ocurre mientras las espermatides se encuentran físicamente adheridas a la membrana plasmática de las células de Sertoli (Ehmcke *et al.* 2006; Grzmil, 2008). Al mantener constante la inoculación del KBrO_3 durante estos eventos (Grupo II) se observó que el porcentaje de espermatozoides MP disminuyó significativamente ($51,70 \pm 3,34$ vs. $58,00 \pm 1,94$ del CN) y que los espermatozoides MNP se incrementaron (sin significancia estadística), finalmente se encontró un incremento significativo en el porcentaje de los espermatozoides NM ($26,50 \pm 3,69$ vs. $19,30 \pm 4,45$ del

CN) mostrando que los efectos sobre la movilidad espermática se incrementan con los días de tratamiento.

El porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó significativamente ($55,60 \pm 2,06$ vs. $75,50 \pm 1,90$ del CN), el test HOST mostró una reducción significativa de espermatozoides con membrana normal ($46,00 \pm 2,70$ frente a los $63,90 \pm 1,90$ del CN), adicionalmente se observó un aumento significativo de las anomalías morfológicas de la cabeza espermática ($3,60 \pm 0,69$ vs. $1,50 \pm 0,70$ del CN) (Tabla N° 4) y que la concentración espermática disminuyó significativamente ($49,80 \pm 3,62$ millones/mL frente a los $55,60 \pm 2,84$ del CN) (Tabla N° 5 y Figura N° 7), los efectos perjudiciales mostrados en la morfología y concentración espermática no se apreciaron en el Grupo I y pueden explicarse debido a que se conoce la capacidad del KBrO_3 para inducir la peroxidación lipídica que altera la membrana celular y oxidación al ADN que altera los patrones de condensación de la cromatina (Kasai *et al.*, 1987; Nakae *et al.*, 2002).

Los análisis realizados a los 21 días y 35 días (correspondientes a las observaciones a partir de los espermatocitos secundarios y espermatogonias respectivamente) evidenciaron que los efectos del KBrO_3 sobre la línea germinal espermátogénica se incrementaron aún más con los días de inoculación mostrando un efecto acumulativo, al realizar las observaciones durante un ciclo espermátogénico completo (Grupo IV) el porcentaje de espermatozoides afectados negativamente superan el 50% del total de células analizadas mostrando que la exposición continua de los animales de experimentación al xenobiótico desestabiliza su potencial fértil.

Adicional a los análisis por espermatogramas, cada animal de experimentación ingresó al análisis de citotoxicidad y genotoxicidad en la línea eritropoyética de la MOR debido a que reportes previos han mostrado efectos nocivos a dosis elevadas del KBrO_3 en las primeras 24 horas (Poul *et al.*, 2004) y aunque en este trabajo se utiliza una dosis

leve (68,89 mg/kg equivalente a 1/3 de la LD₅₀) la exposición al xenobiótico es continua durante un ciclo de espermatogénesis.

Acorde con la Tabla N° 6 y la Figura N° 8, el daño citotóxico (relación EPC/ENC) se puede apreciar en el primer grupo de tratamiento ($0,6479 \pm 0,0153$ frente a $0,9627 \pm 0,0102$ del CN) y se mantiene constante para las observaciones realizadas a lo largo del ciclo espermatogénico ($0,6420 \pm 0,0128$ para el día 15; $0,6275 \pm 0,0185$ para el día 21 y $0,6115 \pm 0,0146$ para el día 35), estas observaciones indirectamente muestran que el número de EPCs y ENCs presentes se mantienen constantes lo cual podría significar que el KBrO₃ no destruye los eritrocitos pero si produce retrasos continuos y no acumulativos durante la fase de maduración de los glóbulos rojos. Adicionalmente se pudo observar que el daño genotóxico inducido fue significativo desde el primer grupo de tratamiento con la formación de $16,05 \pm 1,87$ MNs frente a los $3,20 \pm 1,03$ del CN (Tabla N° 6 y Figura N° 9), el número de MNs formados se incrementa con el número de días ($19,83 \pm 1,94$ para los 15 días; $25,80 \pm 1,64$ para los 21 días y $26,45 \pm 2,13$ para los 35 días), esto significa que los daños en la cromatina aumentan por la acumulación del KBrO₃, quizá debido a la ruptura cromosómica o de las fibras del huso (Schmid, 1975). Es decir que el efecto acumulativo del KBrO₃ en la línea eritropoyética retrasa de forma constante la tasa mitótica a la vez que produce daños más severos a nivel de cromatina.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si existe relación entre los efectos inducidos a la línea germinal y los efectos inducidos a la línea eritropoyética, para ello se utilizó la correlación a través del estadístico R de Pearson que permite relacionar las variables de las dos líneas celulares estudiadas. Acorde con los resultados observados en la Tabla N° 7 no hay correlación existente entre las variables de línea germinal espermatogénica y la línea eritropoyética para la muestra evaluada, con excepción de algunas variables: 1) En el Grupo II existe correlación positiva entre la

citotoxicidad y los espermatozoides con membrana normal (R de 0,780), 2) en el Grupo III se aprecia una correlación negativa entre la genotoxicidad medular y el número de espermatozoides vivos (R de -0,707) y 3) en el Grupo V (CN) hay correlación positiva entre la citotoxicidad y el número de espermatozoides MNP (0,699), NM (-0,875) y vivos (R de 0,652), a pesar que estos números estadísticamente son significativos, no son suficientes para poder establecer una correlación clara entre los efectos negativos de ambas líneas celulares.

VII. CONCLUSIONES

1. Se demostró que el bromato de potasio es un xenobiótico capaz de inducir efectos tóxicos acumulativos (con una dosis diaria de 68,89 mg/kg del peso corporal) en la línea germinal masculina y en la línea eritropoyética de la médula ósea roja para todos los grupos de tratamiento reduciendo significativamente su potencial fértil.
2. La evidencia mostró que la exposición prolongada al bromato de potasio en el ciclo espermatogénico es significativa desde los 7 días de tratamiento (Grupo I) produciendo daños más severos conforme se incrementaron los días de exposición en los grupos de tratamiento restantes, indicando que los efectos tóxicos en los primeros estadios del ciclo espermatogénico son más severos que los producidos en los estadios posteriores.
3. En la línea eritropoyética de la médula ósea roja, los daños citotóxicos y genotóxicos inducidos por el bromato de potasio fueron significativos desde los 7 días de tratamiento (Grupo I) provocando un retraso en la maduración de los eritrocitos policromáticos a normocromáticos que se mantuvo constante en los grupos restantes e incrementando el número de eritrocitos policromáticos con micronúcleos conforme se incrementaron los días de exposición.
4. No se observó una correlación significativa entre las variables espermatogénicas y las variables de la línea eritropoyética analizadas.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Es necesario cuantificar el daño inducido al ADN en ambas líneas celulares por tiempo de exposición y podría realizarse mediante el ensayo cometa, adicionalmente faltan realizar análisis bioquímicos para cada tratamiento con la finalidad de evidenciar la presencia de correlaciones entre las variables estudiadas y metabolitos producidos durante las manifestaciones de los efectos tóxicos como por ejemplo el incremento de las ROS y NOS a nivel espermático y medular.
2. Si bien se empleó la dosis de 68,89 mg/kg de peso corporal del KBrO_3 para evitar la letalidad y observar efectos tóxicos, es necesario elaborar un estudio que permita conocer el consumo real de este tipo de xenobióticos y cuál es la concentración que se encuentra dentro del organismo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afshari A. Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994. 24 (2): 96-102.
2. Agnes V., Akbarsha M. Spermatotoxic effect of aflatoxin B1 in the albino mouse. *FoodChem. Toxicol.* 2003. 41: 119-130.
3. Alvis, R. (2010). Detección del efecto antimutagénico del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia*. H.B.K. Mc Vaugh "camu camu" utilizando la prueba in vivo de micronúcleos. Asesor: José Pino. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2010.
4. Awogi, T., Murata, K., Uejima, M., Kuwahara, T., Asanami, S., Shimono, K., Morita, T. Induction of micronucleated reticulocytes by potassium bromate and potassium chromate in CD-1 male mice. *Mutat. Res.* 1992. 278:181-5
5. Barrios, E., Espinoza, M., Leal, U., Ruiz, N., Pinto, V., Jurado, B. Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salud online* 2011. 15: 2.
6. Bonassi, S., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N. The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN XL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 728. 2011.3: 88-97.
7. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in human. *Carcinogenesis.* 2007. Vol. 28: 625 - 631.

8. Budavari, S., M. O'Neil, A. Smith, P. Heckelman. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. *11th Edition Rahway, NJ: Press* 1989. Merck and Company, Inc.
9. Chipman, J. K., Davies, J. E., Parsons, J. L., Nair, J., O'Neill, G. and Fawell, J. K. DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation? *Toxicol.* 1998. 126: 93–102.
10. Comité asesor de Bioética FONDECYT - CONICYT. Aspecto Bioéticos de la Experimentación animal. 4to Taller de Bioética - FONDECYT. 2009. Capítulo 7. P: 113-122.
11. Cook, M. The Anatomy of the Laboratory Mouse, 1965. Reimpreso en 2014, p. 143.
12. De Angelo A., George, M., Kilburn, S., Moore, T., Wolf, D. Carcinogenicity of Potassium Bromate Administered in the Drinking Water of Male B6C3F1 Mice and F344/N Rats. *Toxicol. Path.* 1998. 26:587-594.
13. Díaz, P. Toxicidad Embrionaria en Ratones Pretratados con el Pesticida Organofosforado "Diazinón". Asesor: José Pino. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2007.
14. Drugs and Diseases reference index. What is bone marrow?. 2010. Acceso: <http://dxline.info/diseases/bone-marrow>. Fecha: 20/07/2014.
15. Drumond, A., Weng, C., Wang, G., Chiarini-García, H., Eras, L., Meistrich, M. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod. Toxicol.* 2012. 32: 395-406.
16. Ehmcke, J., Wistuba, J., Schlatt, S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum. Reprod. Update.* 2006. 12: 275–282.

17. Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000. 455:81-95.
18. Fenech, M., Holland, N., Chang, W., Zeiger, E., Bonassi, S. The Human Micronucleus Project — An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 1999. 428: 271-283.
19. Franca L., Ogawa T., Avarbock R., Brinster R. and Russell L. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 1998. 59:1371-1377.
20. Fuji, M., Oikawa, K., Saito, H. Metabolism of potassium bromate in rats: I. *In vivo* studies. *Chemosphere* 1984. 13:1207-1212.
21. Gonzales, J., Pino, J. Embriotoxicidad del bromato de potasio en ratón (*Mus musculus*). *Rev. peru. biol.* 2007. 14(1):061-064.
22. Grzmil, P. Prm3, the fourth gene in the mouse protamine gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects spermmotility. *Biol. Reprod.* 2008. 78: 958-967.
23. Hayashi, M., Kishi, M., Sofuni, T., Ishidate, J. Micronucleus tests with mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemical substances. *Food Chem.Toxicol.* 1988. 26: 487-500.
24. Hayashi M., Sutou, S., Shimada, H. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: the 3rd collaborative study by CSGMT/JEMSHMS. *Mutat. Res.* 1989. 223: 329-344.
25. Hayashi. S., Watanabe, J., Kawajiri, K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992. 83: 866-870.
26. Heddle, J. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 1991. 18 (4): 277-291.

27. Himata, K., Kuwahara, T., Ando, S., Maruoka, H. Determination of bromate in bread by capillary gas chromatography with a mass detector (GC/MS). *J. Food Addit. Contam.* 1994. 11: 559-569.
28. Hoiberg, D. Enciclopedia Británica. Encyclopaedia Britannica, Inc. 2010.
Acceso: <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/559418/spermatogenesis>.
Fecha: 20/07/2014.
29. Huatuco, M. Efecto del bromato de potasio en la implantación embrionaria en ratones. Asesor: José Pino. UNFV. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática - Tesis para optar al título de licenciada en Biología. UNFV, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Lima, 2008.
30. Ichihara I, Pelliniemi L. Morphometric and ultrastructural analysis of stage-specific effects of Sertoli and spermatogenic cells seen after short-term testosterone treatment in young adult rat testes. *Ann. Anat.* 2007. 189(5):520-32.
31. Inaba K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog. Sci.* 2003. 20: 1043-1056.
32. International Agency for Research on Cancer (IARC). Some chemicals that cause tumors of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. Lyon, (IARC) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 1986. 73: 481- 496.
33. Ishidate, M., Yoshikawa, K. Chromosome aberration test with Chinese hamster cells *in vitro* with and without metabolic activation: A comparative study on mutagens and carcinogens. *Arch. Toxicol. Suppl.* 1980. 4: 41– 44.
34. Junqueira, L., Carneiro, J. Histología Testicular en Histología básica. 4ta. Edic. Madrid: Masson S. A. Press 1996.

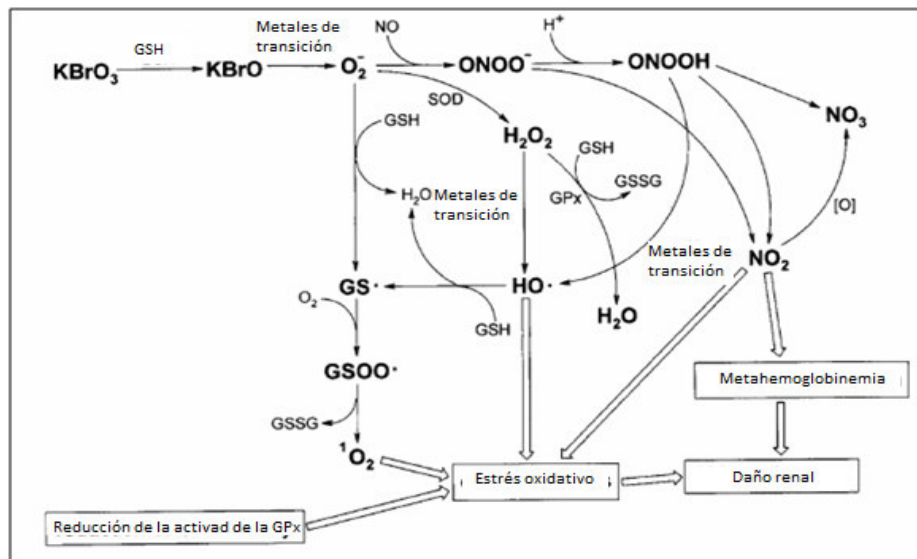
35. Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y., Hayashi, Y. Oral administration of rat renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*. 1998. 8: 1959–1961.
36. Khan N., Sharma S. & S. Sultana. Nigella sativa (black cumin) ameliorates potassium bromate-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003. 22:193-203.
37. Kutom, A., Bazilinski, N., Magana, L. Bromate intoxication: Hairdressers anuria. *Am. J. Kidney Dis.* 1990. 15(1): 84-85.
38. Lele, K., Wolgemuth, D. Distinct Regions of the Mouse Cyclin A1 Gene, Ccna1, Confer Male Germ-Cell Specific Expression and Enhancer Function. *Biol. Reprod.* 2004. 71: 1340-1347.
39. Migliore, L., Bevilacqua, C., Scarpato, R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis*. 1999. 14. (2): 227-231.
40. Migliore, L., Cocchi, L., Scarpato, R. Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis*. 1996. 11 (3): 285-290.
41. Ministerio de Salud del Perú. Compendio de normativa ética para uso por los comités de ética en investigación. Comité editor del Ministerio de Salud. 2011.
42. Monesi, V. Espermatogénesis y espermatozoides. En: Austin CR, Short RV, editores. Células Germinales y Fertilización. Primera Edición. México: Ediciones Copilco. p. 49-88. Press 1982.
43. Nakae, D., Umemura, T., Kurokawa, D. Reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress, a mayor intrinsic factor involved in carcinogenic processes

- and a possible target for cancer prevention. *Asian Pac. J. Canc. Prev.* 2002. 3:313-318.
44. Namasivayam, E., Tzeon-Jye, C., Woan-Fang, T., Sint-tak, C. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicol.* 2006. 222: 60-70.
 45. Norppa H., Falck G. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis.* 2003. 18: 221- 233.
 46. O'Donogue, J., Barber, E., Hill, T., J. Aebi., Fiorica, L. Hydroquinone: Genotoxicity and prevention of genotoxicity following ingestion. *Food and Chem. Toxicol.* 1999. 37: 931-936.
 47. Organización Mundial de la Salud (OMS). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *Department of Reproductive Health and Research.* 2010.
 48. Parker, W., Barr, J. Potassium bromate poisoning. *Brit. Med. J.* 1951. 1: 1363.
 49. Parsons, J., Chipman, J. The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate. *Mutagenesis*, 2002. 15: 311–316.
 50. Piña-Guzmán, B., Solís, M., Quintanilla, B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. 202: 289 – 198.
 51. Pino, J., Noblecilla, M., Díaz, P., León, K., Ponce, C., Alvis, R. Efecto del extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* Willd D. C. sobre la calidad espermática de ratones tratados con ciclofosfamida. *Científica.* 2009. 6 (3): 244 – 249.
 52. Poul J., Huet S., Godard, T., Sanders, P. Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.* 2004. 42: 203–209.

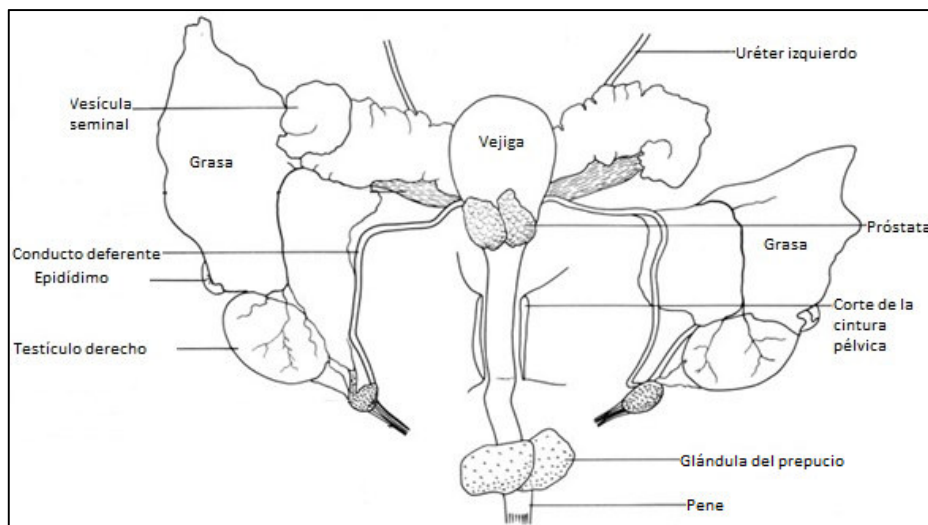
53. Ramos-Remus, C. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2002. 20 (2): 208-212.
54. Ribotta, P., Morcillo, M., León, A. Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional argentino. *Agriscientia.* 1999. 16: 3-10.
55. Rodríguez, E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica.* 2007. 13: 1.
56. Sai, K., Uchiyama, S., Ohno, Y., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. Generation of active oxygen species *in vitro* by the interaction of potassium bromate with rat kidney cell. *Carcinogenesis.* 1992. 13: 333–339.
57. Schmid, W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975. 31 (1): 9-15.
58. Speit G., S. Haupter, P. Schütz, P. Kreis. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.* 1999. 439: 213-221.
59. Speit, G., Haupter, S., Schütz, P., Kreis, P. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 chinese hamster cells. *Mut. Res.* 1999. 439: 213-221.
60. Suzuki, Y., Forman, H., Sevanian, A. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. *Free Radical Bio. Med.* 1997: 22: 269-285.
61. Tanaka, K., Oikawa, K., Fukuhara, C. Metabolism of potassium bromate in rats: II. *In vitro* studies. *Chemosphere.* 1984. 13:1219-1219.
62. Tirado, O., Martínez, E., Rodríguez, O., Danielsen, M., Selva, D., Reventós, J. Methoxyacetic acid disregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Bio. Rep.* 2003. 68:1437-46.
63. Torres-Bugarín, O., De Anda-Casillas, A., Ramírez, M., Sánchez, J., Cantpu, M., Zúñiga, G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1998. 413 (3):277-281.

64. Ueno, H., Oishi, K., Sayato, Y., Nakamuro, K. Oxidative cell damage in Kat-Sod assay of oxyhalides as inorganic disinfection by-products and their occurrence by ozonation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000. 38: 1–6.
65. US. Environmental Protection Agency (US. EPA). Toxicological Review of Bromate EPA/635/R-01/002. 2001.
66. Visible Body. 3D Skeletal System: Compact Bone. Acceso: <http://info.visiblebody.com/bid/263608/3D-Skeletal-System-Compact-Bone-Spongy-Bone-and-Osteons>. 2014. Fecha: 20/07/2014.
67. Watanabe, S., Miyasaka, K., Kawana, K. and Kawauchi, S. Production of active oxygen species and lipid peroxidation by the reaction of potassium bromate and reduced glutathione. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 1993. 39: 445–452.
68. Watanabe, S., Tajima, Y., Yamacuchi T., Fukui, T. Potassium bromate-induced hyperuricemia stimulates acute kidney damage and oxidative stress. *J. Health Sci.* 2004. 50 (6): 647-653.
69. Watanabe, S., Togashi, S., T, Fukui. Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of metahemoglobin concentration in mouse blood. *Biopharm. bullettin.* 2002. 25 (10) 1315-1319.
70. Watanabe, S., Yoshimura, Y., Fukui, T. Contribution of glutathione peroxidase and nitric oxide to potassium bromate induce oxidative stress and kidney damage in mice. *J. of Health Sci.* 2001. 47(6): 565-570.
71. Wolf D., Crosby L., George M. Time and dose-dependent development of Potasium bromate – Induced tumors in male Fischer 344 Rats. *Toxicol. Path.* 1998. 26(6):724 - 729.

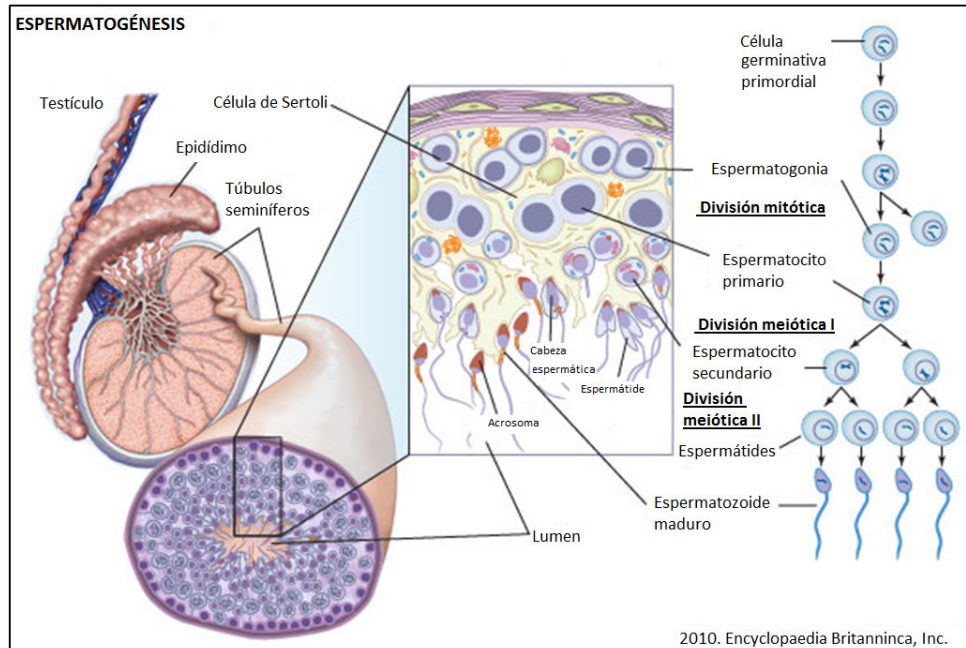
X. ANEXOS



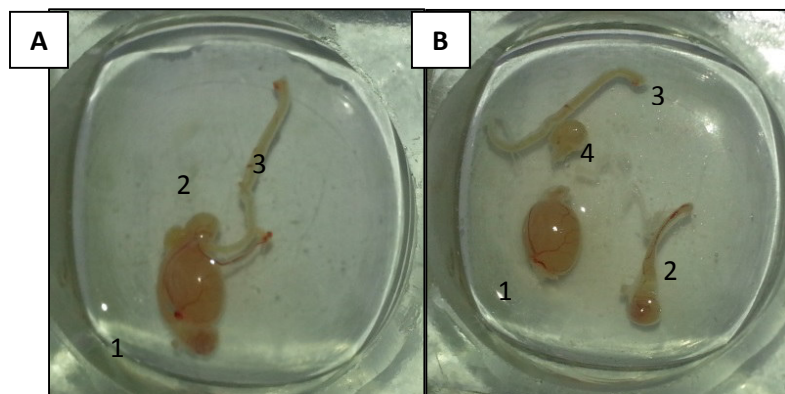
Anexo N° 1: Esquema del mecanismo de acción del KBrO_3 dentro del riñón. Tomado de Watanabe *et al.*, (2001) y traducido por el autor.



Anexo N° 2: Esquema del sistema reproductor masculino de *Mus musculus* señalando sus partes, tomado de Cook (2014) y traducido por el autor.



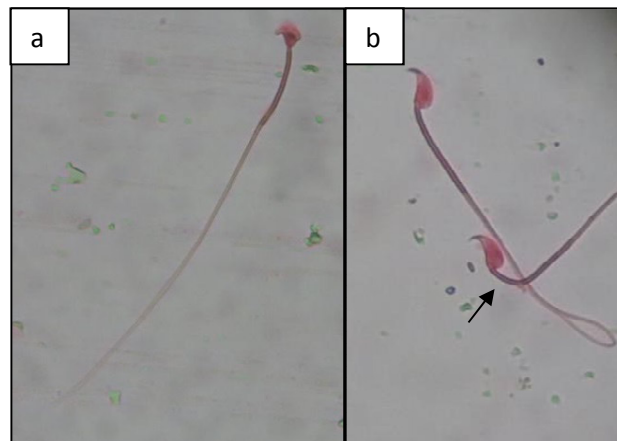
Anexo N° 3: Esquema general de la espermatogénesis mostrando parte del sistema reproductor masculino de ratón y las estructuras que permiten la realización del ciclo espermatogénico. Encyclopaedia Britannica, Inc. (2010).



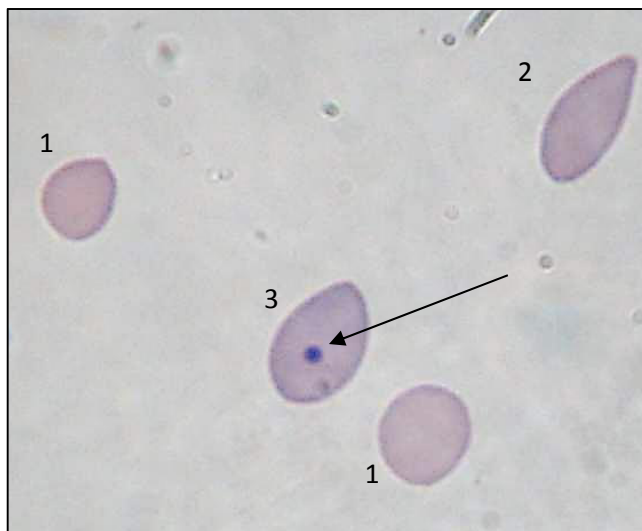
Anexo N° 4: Fotografía de los órganos reproductivos con resolución de 5MP. A) Órganos unidos y B) órganos seccionados (1: Testículo, 2: Epidídimo, 3: Conducto deferente y 4: Cuerpo graso).



Anexo N° 5: Fotomicrografía de espermatozoides normales de ratón (*Mus musculus*), tomada con microscopía de campo claro, mostrando: 1) La cabeza, 2) pieza intermedia y 3) flagela o cola. Aumento: 400X.



Anexo N° 6: Fotomicrografía de espermatozoides anormales de ratón (*Mus musculus*) tomados con microscopía de campo claro. a) Espermatozoide con región cefálica anormal y b) pieza intermedia anormal (flecha). Coloración: Eosina Y. Aumento: 400X.



Anexo N° 7: Fotomicrografía de células de la Médula Ósea Roja de ratón tratado con KBrO_3 y evaluados con el test de Mn. 1) ENC, 2) EPC y 3) EPC con MN (flecha). Aumento; 400X.

Tabla N° 8: Datos obtenidos mediante los espermogramas aplicados a los ratones de cada grupo de tratamiento. Var. PC: Variación del peso corporal, Test. Der.: Testículo derecho, Cond. Def.: Conducto deferente, Ep. C+C: Cabeza y cuerpo del epidídimo, Ep. Cola: Cola del epidídimo, MP: Móviles progresivos, MNP: Móviles no progresivos, NM: No móviles. Conteo de 100 células espermáticas por cada variable.

Grupo	Var. PC	Peso				Movilidad			Vitalidad	
		Test. Der.	Cond. Def.	Ep. C+C	Ep. Cola	MP	MNP	NM	Vivos	Muertos
I	3.3	0.104	0.011	0.0217	0.0128	57	19	24	70	30
I	3.9	0.1036	0.0109	0.0218	0.0128	56	19	25	68	32
I	3.8	0.1052	0.0108	0.0221	0.0115	52	18	30	69	31
I	3.0	0.1048	0.0114	0.0226	0.0117	51	16	33	71	29
I	3.6	0.1045	0.0109	0.0224	0.0124	56	15	29	67	33
I	3.6	0.1056	0.0107	0.0219	0.0121	61	19	20	73	27
I	3.5	0.1041	0.0113	0.0219	0.0119	57	15	28	68	32
I	3.3	0.1036	0.0108	0.0215	0.0122	60	13	27	66	34
I	3.5	0.1044	0.0107	0.0217	0.0124	56	19	25	66	34
I	3.8	0.1025	0.0109	0.0221	0.0119	59	17	24	71	29
II	3.8	0.1031	0.0108	0.022	0.0125	50	16	34	56	44
II	4.1	0.1025	0.011	0.0223	0.0116	58	17	25	54	46
II	3.9	0.1021	0.0106	0.0218	0.0121	49	22	29	58	42
II	4.0	0.1034	0.0105	0.0221	0.012	46	17	37	59	41
II	3.5	0.1019	0.011	0.0215	0.0118	53	14	33	57	43
II	4.2	0.1034	0.0108	0.0212	0.0115	50	25	25	54	46
II	4.2	0.1038	0.01	0.0221	0.0121	52	19	29	56	44
II	3.8	0.1028	0.0101	0.0216	0.0117	55	21	24	53	47
II	3.6	0.1021	0.0107	0.0213	0.0115	51	19	30	53	47
II	4.3	0.1032	0.0111	0.0212	0.0123	53	20	27	56	44
III	4.3	0.1012	0.0096	0.0215	0.0121	47	18	35	48	52
III	4.6	0.1008	0.0101	0.0211	0.012	46	22	32	49	51
III	3.9	0.101	0.0099	0.0217	0.0115	47	23	30	46	54
III	3.8	0.1011	0.0103	0.0214	0.0119	53	24	23	44	56
III	4.1	0.1001	0.0104	0.0211	0.0121	53	18	29	47	53
III	4.7	0.0995	0.0106	0.0209	0.0122	49	20	31	47	53
III	3.7	0.0999	0.0104	0.0212	0.0118	45	21	34	45	55
III	4.2	0.1012	0.0102	0.0215	0.0114	42	22	36	48	52
III	4.0	0.1014	0.0101	0.0218	0.0113	44	20	36	44	56
III	4.5	0.1011	0.0096	0.0217	0.0115	45	19	36	45	55
IV	4.9	0.0989	0.0093	0.0208	0.012	46	18	36	41	59

IV	4.7	0.0975	0.0091	0.0211	0.0114	44	18	38	40	60
IV	5.0	0.099	0.0097	0.0207	0.0113	47	19	34	42	58
IV	5.2	0.0979	0.0095	0.0205	0.0119	42	13	45	43	57
IV	5.0	0.0972	0.0093	0.0201	0.0121	44	17	39	40	60
IV	4.8	0.0969	0.0095	0.0207	0.012	48	16	36	38	62
IV	4.4	0.0971	0.0102	0.0204	0.0115	45	19	36	41	59
IV	5.7	0.0988	0.0103	0.0208	0.0117	51	18	31	42	58
IV	4.1	0.0969	0.0098	0.0206	0.0114	44	17	39	41	59
IV	5.2	0.0971	0.0095	0.0206	0.0119	47	15	38	40	60
V	3.6	0.1028	0.0105	0.022	0.0124	60	17	23	76	24
V	3.6	0.103	0.0109	0.0215	0.0128	58	26	16	78	22
V	3.5	0.1031	0.011	0.0242	0.0128	56	27	17	77	23
V	3.0	0.1127	0.0107	0.0215	0.0119	56	28	16	75	25
V	3.6	0.1045	0.0103	0.0219	0.0123	56	29	15	78	22
V	3.6	0.1034	0.0112	0.0218	0.0121	58	18	24	72	28
V	3.5	0.1036	0.0105	0.022	0.0124	57	17	26	74	26
V	3.3	0.1045	0.0106	0.0228	0.0126	59	27	14	76	24
V	3.5	0.1034	0.0104	0.0218	0.0117	58	18	24	75	25
V	3.8	0.1034	0.0104	0.0222	0.0121	62	20	18	74	26

Tabla N° 9: Datos obtenidos mediante los espermogramas aplicados a los ratones de cada grupo de tratamiento. PI: Pieza intermedia. Conteo de 100 células espermáticas por cada variable.

Grupo	Integridad membrana (Prueba HOST)		Morfología				Concentración espermática (millones/mL)
	Normales	Anormales	Normal	Cabeza	PI	Cola	
I	48	52	96	1	1	2	57
I	49	51	96	2	2	0	55
I	51	49	98	0	0	2	52
I	48	52	96	2	1	1	49
I	45	55	98	2	0	0	57
I	50	50	97	1	0	2	48
I	52	48	96	2	2	0	52
I	54	46	97	2	0	1	45
I	48	52	96	2	1	1	55
I	49	51	99	1	0	0	51
II	46	54	93	3	2	2	55
II	47	53	94	4	1	1	47
II	49	51	91	4	2	3	48
II	46	54	95	3	0	2	44
II	43	57	94	3	2	1	51
II	45	55	95	4	1	0	48
II	48	52	93	3	1	3	53
II	50	50	94	3	1	2	55
II	45	55	90	5	3	2	48
II	41	59	94	4	1	1	49
III	39	61	92	3	2	3	47
III	37	63	91	4	2	3	45
III	38	62	89	5	4	2	47
III	43	57	91	5	3	1	49
III	40	60	92	4	1	3	53
III	44	56	90	5	2	3	44
III	41	59	91	4	3	2	43
III	39	61	93	3	2	2	44
III	42	58	89	5	3	3	43
III	43	57	88	5	4	3	43
IV	37	63	89	4	4	3	38
IV	38	62	88	4	5	3	37
IV	39	61	88	5	3	4	34
IV	37	63	87	6	5	2	46

IV	36	64	88	5	4	3	36
IV	40	60	88	4	4	4	35
IV	39	61	88	5	3	4	34
IV	37	63	88	6	3	3	33
IV	40	60	84	8	5	3	36
IV	35	65	87	6	5	2	36
V	63	37	97	2	0	1	57
V	65	35	96	1	2	1	61
V	64	36	96	3	0	1	55
V	62	38	95	3	0	2	54
V	64	36	96	3	0	1	59
V	64	36	97	2	1	0	54
V	66	34	97	3	0	0	52
V	67	33	96	1	1	2	54
V	61	39	97	2	0	1	53
V	63	37	97	3	0	0	57

Tabla N° 10: Datos obtenidos mediante la extracción de la MOR de los ratones de cada grupo de tratamiento. EPC/ENC: Índice de citotoxicidad entre los eritrocitos policromáticos y los eritrocitos normocromáticos para evaluación de la citotoxicidad, EPC-1MN: Genotoxicidad determinada por el número de eritrocitos policromáticos con 1 micronúcleo dentro de un conteo de 2000 EPCs.

Grupo	EPC/ENC	EPC-1MN	Grupo	EPC/ENC	EPC-1MN
I	0.6407	15	III	0.6515	27
I	0.6447	15	III	0.6142	25
I	0.6407	16	III	0.6026	28
I	0.6653	17	III	0.6380	26
I	0.6461	18	III	0.6407	24
I	0.6447	18	III	0.6077	27
I	0.6380	17	III	0.6556	25
I	0.6529	15	III	0.6447	23
I	0.6434	19	III	0.6543	27
I	0.6380	15	III	0.6077	29
I	0.6515	13	III	0.6103	25
I	0.6515	14	III	0.6380	26
I	0.6570	15	III	0.6407	26
I	0.6625	16	III	0.6038	25
I	0.6598	15	IV	0.5974	28
I	0.6327	19	IV	0.6077	25
I	0.6434	13	IV	0.6380	24
I	0.6543	19	IV	0.6340	29
I	0.6515	17	IV	0.6116	26
I	0.6367	15	IV	0.6273	24
II	0.6353	18	IV	0.6116	28
II	0.6367	18	IV	0.6077	26
II	0.6543	20	IV	0.5974	22
II	0.6407	16	IV	0.5987	27
II	0.6313	21	IV	0.5987	25
II	0.6407	18	IV	0.5987	28
II	0.6447	22	IV	0.6142	26
II	0.6515	20	IV	0.6313	28
II	0.6543	19	IV	0.6077	28
II	0.6194	18	IV	0.5936	30
II	0.6515	22	IV	0.6247	26

II	0.6598	23	IV	0.6300	29
II	0.6611	20	IV	0.6103	27
II	0.6407	19	IV	0.5898	23
II	0.6380	22	V	0.9589	2
II	0.6515	21	V	0.9704	5
II	0.6287	18	V	0.9608	3
II	0.6168	22	V	0.9627	4
III	0.6420	27	V	0.9704	2
III	0.6064	24	V	0.9531	4
III	0.6116	26	V	0.9550	3
III	0.6380	28	V	0.9724	3
III	0.6168	25	V	0.9589	4
III	0.6273	23	V	0.9685	2

Tabla N° 11: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de todas las variables estudiadas.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra								
	N	Parámetros normales ^{a,b}		Diferencias más extremas			Z de Kolmogorov-Smirnov	Sig. asintót. (bilateral)
		Media	Desviación típica	Absoluta	Positiva	Negativa		
Variación del peso	50	4,0100	,60178	,136	,136	-,098	,965	,310
Peso de testículo	50	,101992	,0029095	,114	,114	-,109	,809	,530
Peso de conducto deferente	50	,010398	,0005712	,101	,079	-,101	,718	,682
Peso de epidídimo	50	,021574	,0007050	,108	,108	-,098	,762	,606
Peso de cola del epidídimo	50	,011978	,0004127	,104	,104	-,065	,734	,655
Espermatozoides MP	50	51,82	5,695	,149	,121	-,149	1,050	,220
Espermatozoides MNP	50	19,28	3,720	,190	,190	-,090	1,344	,054
Espermatozoides NM	50	28,90	7,175	,081	,067	-,081	,576	,895
Vitalidad espermática	50	57,42	13,389	,139	,139	-,139	,984	,287
Mortalidad espermática	50	42,58	13,389	,139	,139	-,139	,984	,287
Integridad de memb. Normal (Host +)	50	47,54	9,468	,139	,139	-,122	,981	,291
Integridad de memb. Anormal (Host -)	50	52,46	9,468	,139	,122	-,139	,981	,291
Morfología normal	50	92,94	3,798	,170	,110	-,170	1,201	,112
Anomalías de cabeza	50	3,40	1,616	,138	,138	-,105	,974	,299
Anomalías de pieza intermedia	50	1,84	1,595	,181	,181	-,124	1,278	,076
Anomalías del flagelo	50	1,82	1,173	,163	,158	-,163	1,152	,141
Concentración espermática	50	47,96	7,420	,107	,090	-,107	,756	,617
Citotoxicidad (EPC/ENC)	88	,669611	,0073630	,402	,402	-,229	3,775	,617
Genotoxicidad (EPC-1MN)	88	19,94	7,519	,119	,103	-,119	,310	,164

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Tabla N° 12: Prueba de Levene mediante ANOVA para determinar la homogeneidad de varianzas de todas las variables estudiadas.

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Variación del peso	1,302	4	45	,284
Peso de testículo	1,827	4	45	,140
Peso de conducto deferente	,706	4	45	,592
Peso de epidídimo	2,061	4	45	,102
Peso de cola del epidídimo	,360	4	45	,836
Espermatozoides MP	,787	4	45	,540
Espermatozoides MNP	1,459	4	45	,085
Espermatozoides NM	,538	4	45	,708
Vitalidad espermática	,995	4	45	,420
Mortalidad espermática	,995	4	45	,420
Integridad de memb. Normal (Host +)	,668	4	45	,618
Integridad de memb. Anormal (Host -)	,668	4	45	,618
Morfología normal	1,324	4	45	,276
Anomalías de cabeza	1,088	4	45	,374
Anomalías de pieza intermedia	,425	4	45	,790
Anomalías del flagelo	,531	4	45	,713
Concentración espermática	,326	4	45	,859
Citotoxicidad (EPC/ENC)	1,783	4	45	,098
Genotoxicidad (EPC-1MN)	1,264	4	45	,298

Tabla N° 13: Prueba ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para las variables estudiadas.

Variables		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Variación del peso	Inter-grupos	13,164	4	3,291	32,328	,000
	Intra-grupos	4,581	45	,102		
	Total	17,745	49			
Peso de testículo	Inter-grupos	,000	4	,000	35,327	,000
	Intra-grupos	,000	45	,000		
	Total	,000	49			
Peso de conducto deferente	Inter-grupos	,000	4	,000	25,424	,000
	Intra-grupos	,000	45	,000		
	Total	,000	49			
Peso de epidídimo	Inter-grupos	,000	4	,000	16,707	,000
	Intra-grupos	,000	45	,000		
	Total	,000	49			
Peso de cola del epidídimo	Inter-grupos	,000	4	,000	5,019	,002
	Intra-grupos	,000	45	,000		
	Total	,000	49			
Espermatozoides MP	Inter-grupos	1186,280	4	296,570	33,108	,000
	Intra-grupos	403,100	45	8,958		
	Total	1589,380	49			
Espermatozoides MNP	Inter-grupos	241,880	4	60,470	6,238	,000
	Intra-grupos	436,200	45	9,693		
	Total	678,080	49			
Espermatozoides NM	Inter-grupos	1778,600	4	444,650	26,898	,000
	Intra-grupos	743,900	45	16,531		
	Total	2522,500	49			
Vitalidad espermática	Inter-grupos	8618,680	4	2154,670	585,862	,000
	Intra-grupos	165,500	45	3,678		
	Total	8784,180	49			
Integridad de memb. Normal (Host +)	Inter-grupos	4165,120	4	1041,280	206,149	,000
	Intra-grupos	227,300	45	5,051		
	Total	4392,420	49			

Morfología normal	Inter-grupos	628,520	4	157,130	90,305	,000
	Intra-grupos	78,300	45	1,740		
	Total	706,820	49			
Anomalías de cabeza	Inter-grupos	92,800	4	23,200	29,659	,000
	Intra-grupos	35,200	45	,782		
	Total	128,000	49			
Anomalías de pieza intermedia	Inter-grupos	92,520	4	23,130	32,325	,000
	Intra-grupos	32,200	45	,716		
	Total	124,720	49			
Anomalías del flagelo	Inter-grupos	38,080	4	9,520	14,621	,000
	Intra-grupos	29,300	45	,651		
	Total	67,380	49			
Concentración espermática	Inter-grupos	2148,920	4	537,230	44,035	,000
	Intra-grupos	549,000	45	12,200		
	Total	2697,920	49			
Citotoxicidad (EPC/ENC)	Inter-grupos	,889	4	,222	1492,825	,000
	Intra-grupos	,007	45	,000		
	Total	,895	49			
Genotoxicidad (EPC-1MN)	Inter-grupos	3470,600	4	867,650	310,121	,000
	Intra-grupos	125,900	45	2,798		
	Total	3596,500	49			

Todas las variables estudiadas muestran diferencias significativas entre los grupos (nivel de significancia $p < 0,05$)